

**Michigazon, ein neues Pigment vom Phenoxazon-Typ
aus Streptomyces michiganensis**

Isolierung, Strukturermittlung, Synthese
und

**Untersuchungen zum massenspektrometrischen Zerfall
von Phenoxazonen**

Studium des Substituenteneinflusses sowie
ungewöhnlicher Fragmentierungsreaktionen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Albert-Ludwigs-Universität
zu Freiburg im Breisgau

vorgelegt von
Jürgen Wörth
aus Rheinhausen

1979

**Michigazon, ein neues Pigment vom Phenoxazon-Typ
aus Streptomyces michiganensis**

Isolierung, Strukturermittlung, Synthese
und

**Untersuchungen zum massenspektrometrischen Zerfall
von Phenoxazonen**

Studium des Substituenteneinflusses sowie
ungewöhnlicher Fragmentierungsreaktionen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Albert-Ludwigs-Universität
zu Freiburg im Breisgau

vorgelegt von
Jürgen Wörth
aus Rheinhausen

1979

Dekan: Prof.Dr.G.Wegner
Leiter der Arbeit: Prof.Dr.H.Achenbach
Referent: Prof.Dr.H.Achenbach
Korreferent: Prof.Dr.H.Prinzbach

Tag der Bekanntgabe des Prüfungsergebnisses:

20. Dezember 1979

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

G.WOLF, J.WÜRTH und H.ACHENBACH, Arch.Microbiol. 106, 245 (1975)

H.ACHENBACH und J.WÜRTH, Chem.Ber. 110, 12 (1977)



Dem Leiter dieser Arbeit, meinem verehrten Lehrer

Herrn Prof.Dr.H.Achenbach

danke ich für seine ständige Bereitschaft zur Diskussion, seine in jeder Hinsicht großzügige Förderung sowie die mir immer gewährte Freiheit bei der Auswahl und Durchführung der Experimente.

Herrn Prof.Dr.H.Zähner und Frau Dr.G.Wolf, Universität Tübingen, danke ich für die Durchführung der Fermentationen, die Bereitstellung der Rohextrakte von Streptomyces michiganensis Tü 1074 sowie für zahlreiche biologische Tests und die immer gute Kooperation.

Besonderen Dank schulde ich Frau Ingrid Hamm und Frau Piroska Novotny für umfangreiche und umsichtige Hilfe bei den Experimenten, Herrn Dr.D.Hunkler für die Anfertigung zahlreicher Kernresonanzspektren in FT-Technik und der Fa. VARIAN MAT in Bremen für die Aufnahme der Felddesorptionsmassenspektren.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG.....	1
1.1. Isolierung,Strukturaufklärung und Synthese von Naturstoffen.....	1
1.2. Vorbemerkungen zur Massenspektrometrie.....	3
1.3. Spezielle massenspektrometrische Untersuchungs- verfahren.....	8
1.3.1. Metastabile Signale.....	8
1.3.2. CA(collisional activation)-Spektren.....	10
1.3.3. Massenspektren isotopenmarkierter Verbindungen....	11
1.4. Ausgangspunkt und Ziele der vorliegenden Arbeit....	12
2. ALLGEMEINER TEIL.....	17
2.1. Isolierung des violetten Pigmentes.....	17
2.2. Ermittlung der Struktur des violetten Pigmentes....	20
2.2.1. Elektronenspektrum.....	20
2.2.2. Massenspektren.....	21
2.2.3. Vergleich mit authentischem Mitomycin A.....	22
2.3. Isolierung des roten Pigmentes.....	23
2.4. Strukturermittlung des roten Pigmentes.....	24
2.4.1. Massenspektrum.....	24
2.4.2. Elektronen- und IR-Spektrum.....	26
2.4.3. Katalytische Hydrierung.....	28
2.4.4. Acetylierung.....	28
2.4.5. ¹ H-NMR-Spektren.....	28
2.4.6. Alkalischer Abbau.....	31
2.4.7. ¹ H-NMR-Spektren von Vergleichsverbindungen- Ermittlung der Struktur des roten Pigmentes.....	34
2.5. Massenspektrometrische Untersuchungen an Phenoxazonen.....	38
2.5.1. Erarbeitung eines Fragmentierungsschemas für den MS-Zerfall von Michigazon.....	38
2.5.1.1. Das Massenspektrum von unsubstituiertem Phenoxazon.	39
2.5.1.2. Das Massenspektrum von 8-Methylphenoxazon(<u>28</u>).....	42

	Seite
2.5.1.3. Das Massenspektrum von 2-Methoxy-8-methyl-phenoxazon(<u>29</u>).....	42
2.5.1.4. Fazit von Kap. 2.5.1.2. und 2.5.1.3.	51
2.5.1.5. Das Massenspektrum von 4-Methoxy-8-methyl-phenoxazon(<u>30</u>).....	51
2.5.1.6. Fazit von Kap. 2.5.1.5.	56
2.5.1.7. Die Massenspektren der 2,4-Dimethoxyphenoxazone....	56
2.5.1.7.1. H ₂ O-Eliminierung aus dem Molekölion: Herkunft der Atome, die in das Wassermolekül inkorporiert werden	58
2.5.1.7.2. Fazit von Kap. 2.5.1.7.1.	63
2.5.1.7.3. Literaturanalogien zur H ₂ O-Abspaltung aus den Molekölionen von 2,4-Dimethoxyphenoxazonen.....	64
2.5.1.7.4. Bildung des Fragmentes M-H ₂ O in den Massenspektren von 2,4-Dimethoxyphenoxazonen: Vorschlag für den Fragmentierungsmechanismus und die Struktur des Fragmentions.....	66
2.5.1.7.5. Aufstellung eines Fragmentierungsschemas für den MS-Zerfall von 2,4-Dimethoxyphenoxazonen am Beispiel von <u>31</u>	68
2.5.1.8. Fazit von Kap. 2.5.1.7.	72
2.5.2. Strukturelle Randbedingungen für das Auftreten eines signifikanten Fragmentes M-H ₂ O in den Massenspektren von Phenoxazonen.....	73
2.5.2.1. Die Massenspektren von 1,4-Dimethoxy-8-methyl-phenoxazon(<u>46</u>) und 1,2-Dimethoxy-8-methyl-phenoxazon(<u>47</u>)	73
2.5.2.2. Fazit von Kap. 2.5.2.1.	76
2.5.2.3. Das Massenspektrum von 2,4-Dimethoxy-3-hydroxy-8-methylphenoxazin(<u>48</u>)	76
2.5.2.4. Einfluß zusätzlicher Substituenten auf den MS-Zerfall von 2,4-Dimethoxyphenoxazonen: Nitrogruppen und Chloratome	77
2.5.2.4.1. Die Massenspektren von 2,4-Dimethoxy-8-nitro-phenoxazon(<u>49</u>) und 2,4-Dimethoxy-7-nitro-phenoxazon(<u>50</u>)	78

	Seite
2.5.2.4.2. Das Massenspektrum von 1-Chlor-2,4-dimethoxy- -8-methylphenoxazon(<u>51</u>)	81
2.5.2.4.3. Das Massenspektrum von 1-Chlor-2,4-dimethoxy- -7-nitrophenoxazon(<u>52</u>)	81
2.5.2.5. Fazit von Kap. 2.5.2.4.	82
2.5.2.6. MS-Zerfall von 2,4-Dialkoxyphenoxazonen: Ethoxy- - anstelle von Methoxyfunktionen	82
2.5.2.6.1. Das Massenspektrum von 2-Ethoxy-4-methoxy- -8-methylphenoxazon(<u>53</u>)	83
2.5.2.6.2. Das Massenspektrum von 4-Ethoxy-2-methoxy- -8-methylphenoxazon(<u>54</u>)	87
2.5.2.7. Fazit von Kap. 2.5.2.6.	92
2.5.3. Erweiterung der Untersuchung von Substituentenein- flüssen auf die elektronenstoßinduzierte Fragmentierung von Phenoxazonen	94
2.5.3.1. Das Massenspektrum von 4,8-Dimethylphenoxazon(<u>55</u>)..	94
2.5.3.2. Die Massenspektren von Hydroxyphenoxazonen	96
2.5.3.2.1. Die Massenspektren von 2-Hydroxy-8-methyl- phenoxazon(<u>56</u>) und 2,4-Dihydroxy-8-methyl- phenoxazon(<u>57</u>)	96
2.5.3.2.2. Die Massenspektren von 4,8-Dimethyl-2-hydroxy- phenoxazon(<u>58</u>) und 4-Ethyl-2-hydroxy-8-methyl- phenoxazon(<u>59</u>)	97
2.5.3.3. Fazit von Kap. 2.5.3.2.	99
2.5.3.4. Die Massenspektren von 4,8-Dimethyl-2-methoxy- phenoxazon(<u>60</u>) und 4-Ethyl-2-methoxy-8-methyl- phenoxazon(<u>61</u>)	99
2.5.3.5. Fazit von Kap. 2.5.3.4.	102
2.5.3.6. Das Massenspektrum von 4-Hydroxy-2-methoxy- -8-methylphenoxazon(<u>62</u>)	102
2.5.3.7. Fazit von Kap. 2.5.3.6.	105
2.5.3.8. Die Massenspektren von 2-Chlor-4-methoxy-8-methyl- phenoxazon(<u>63</u>), 1,2-Dichlor-4-methoxy-8-methyl- phenoxazon(<u>64</u>) und 2,7-Dichlor-4-methoxy-8-methyl- phenoxazon(<u>65</u>)	106

	Seite
2.5.3.9. Das Massenspektrum von 2-Hydroxy-4-methoxy- -8-methylphenoxazon(<u>66</u>)	108
2.5.3.10. Fazit von Kap. 2.5.3.9.	111
2.5.3.11. Das Massenspektrum von 1,4-Dimethoxy-2-hydroxy- -8-methylphenoxazon(<u>67</u>)	112
2.5.3.12. Das Massenspektrum von 8-Methyl-1,2,4-trimethoxy- phenoxazon(<u>68</u>)	114
2.5.3.13. Fazit von Kap. 2.5.3.11. und 2.5.3.12.	116
2.6. Die Massenspektren hydroxy- und methoxysubstitu- ierter p-Benzochinone	118
2.7. Thermolyse von 2,4-Dimethoxy-8-methylphenoxazon(<u>31</u>)	120
2.8. Synthese der Phenoxazone und Benzochinone.....	122
2.8.1. Aufbau des Phenoxazonringsystems.....	122
2.8.1.1. Die "Aminophenoloxydation"	122
2.8.1.2. Die "KEHRMANN-Reaktion"	123
2.8.2. Darstellung von Michigazon(<u>27</u>)	126
2.8.3. Darstellung weiterer Phenoxazone mittels "KEHRMANN-Reaktion"	130
2.8.3.1. Einsatz unterschiedlich substituierter 2-Aminophenole	130
2.8.3.2. Darstellung von 2,4-Dihydroxyphenoxazonen	131
2.8.3.3. Darstellung von 1,4-Dimethoxy-2-hydroxyphenoxazonen	132
2.8.3.4. darstellung von 2-Hydroxy- und 4-Alkyl-2-hydroxy- phenoxazonen	133
2.8.4. Zusammenfassung der durchgeführten "KEHRMANN-Reaktionen"	133
2.8.5. Darstellung von 2-Alkoxy-4-hydroxyphenoxazonen und 2,4-Dialkoxyphenoxazonen	136
2.8.6. Darstellung deuteriummarkierter Phenoxazone mittels CH_3OD	137
2.8.7. Darstellung ^{18}O -markierter Phenoxazone mittels H_2^{18}O	138
2.8.8. Darstellung von 4-Alkoxy-2-hydroxyphenoxazonen	143
2.8.9. Fazit von Kap. 2.8.5. bis 2.8.8.	143

	Seite
2.8.10. Darstellung von 1-Chlor-2-hydroxy-4-methoxy-phenoxazonen und 1-Chlor-2,4-dimethoxyphenoxazonen	144
2.8.11. Darstellung von 2-Chlorphenoxazonen und deren Dehalogenierung	146
2.8.12. Darstellung von 1,2-Dimethoxy-8-methylphenoxazon(<u>47</u>)	150
2.8.13. Darstellung der Benzochinone <u>23</u> , <u>24</u> und <u>26</u>	152
3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION	153
3.1. Mitomycine und Phenoxazone: natürliches Vorkommen, chemische und biologische Eigenschaften	153
3.2. Biogenetische Aspekte	157
3.3. Synthetische Aspekte	159
3.4. Aspekte der Massenspektrometrie von Phenoxazonen ..	167
3.4.1. Einfluß verschiedener Substituenten auf das Fragmentierungsverhalten	167
3.4.2. Interessante neue Umlagerungsreaktionen	168
3.4.3. Strukturanalytischer Informationsgehalt der Massenspektren von Phenoxazonen	173
3.5. Ausblick	181
4. EXPERIMENTELLER TEIL	183
4.1. Geräte und Methoden	183
4.2. Isolierung und Strukturermittlung der Pigmente	186
4.3. Synthesen	192
4.3.1. 2-Aminophenole	192
4.3.2. 1,4-Benzochinone	193
4.3.3. Phenoxazone	200
4.3.3.1. Allgemeine Arbeitsvorschriften	200
4.3.3.2. unsubstituiertes Phenoxazon(<u>7</u>)	201
4.3.3.3. Michigazon(<u>27</u>) und dessen Strukturbeweis	202
4.3.3.4. Weitere Phenoxazone durch KEHRMANN-Reaktion sowie deren Acetylierungs- und Alkylierungsprodukte	204
4.3.3.5. Umsetzungen mit CH ₃ OD	214
4.3.3.6. ¹⁸ O-markierte Phenoxazone	215

	Seite
4.3.3.7. 4-Ethoxy-2-hydroxy-8-methylphenoxazon(<u>126</u>)	218
4.3.3.8. Chlorphenoxazone durch Umsetzung mit HCl in THF ...	219
4.3.3.9. Chlorphenoxazone durch Umsetzung mit Thionyl- chlorid und deren katalytische Hydrierung	220
4.3.3.10. 2,4-Dimethoxy-3-hydroxy-8-methylphenoxazin(<u>48</u>)	224
4.3.3.11. 1,2-Dimethoxy-8-methylphenoxazon(<u>47</u>)	224
4.4. Thermolyse von 2,4-Dimethoxy-8-methylphenoxazon(<u>31</u>)	226
5. ZUSAMMENFASSUNG	227
6. LITERATURVERZEICHNIS	232

Verwendete Abkürzungen:

DC	Dünnschichtchromatogramm, Dünnschichtchromatographie, dünn-schichtchromatographisch
EI-MS	Elektronenstoß-Massenspektrum
FD-MS	Felddesorptions-Massenspektrum
FT-NMR	Fourier-Transformations-Kernresonanzspektrum
GC	Gaschromatogramm, Gaschromatographie, gaschromatographisch
i.Vak.	im Vakuum
KG	Kieselgel
ME	Masseneinheit
MeOH	Methanol
MG	Molekulargewicht
MS	Massenspektrum, Massenspektrometrie, massenspektrometrisch
präp.	präparativ
<u>S.</u>	<u>Streptomyces</u>
SC	Säulenchromatographie, säulenchromatographisch
Schmp.	Schmelzpunkt
T _D	Durchbruchstemperatur (GC)
Zers.	Zersetzung

1. EINLEITUNG

1.1. Isolierung, Strukturaufklärung und Synthese von Naturstoffen

Der Sekundärstoffwechsel von Pflanzen und Mikroorganismen erzeugt eine Vielfalt niedermolekularer chemischer Verbindungen, unter denen häufig Substanzen zu finden sind, die zuvor unbekannt waren. Wichtige Aufgaben der Naturstoffchemie bestehen in der Isolierung, Strukturermittlung und Synthese dieser neuen Verbindungen, Aufgaben, die mit steigender Komplexität und Empfindlichkeit des untersuchten Moleküls zwar schwieriger, aber damit auch reizvoller werden. Eine zusätzliche Motivation liegt vor, wenn das Molekül biologische Aktivität besitzt, also z.B. antibiotische oder insektizide Wirkung zeigt. Aber auch biologisch inaktive Substanzen können von Interesse sein, sei es wegen neuartiger chemischer oder physikochemischer Eigenschaften oder da sie z.B. neue Einblicke in biogenetische oder chemotaxonomische Zusammenhänge eröffnen.

Nur in wenigen Fällen liegen von vornherein größere Mengen einer reinen Verbindung zu deren Strukturaufklärung vor. Meist gilt es, aus einem komplexen Substanzgemisch die einzelnen Verbindungen zunächst zu isolieren. Dies geschieht in der Regel durch Anwendung verschiedener chromatographischer Verfahren, die in jüngerer Zeit vor allem durch Einführung der Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC)¹⁾ und der Kapillargaschromatographie²⁾ außerordentlich leistungsfähige Erweiterungen erfahren haben. Diese Trennoperationen sind in den meisten Fällen zeitraubend und unvermeidbar mit Substanzverlusten verbunden. Hat man es darüberhinaus mit chemisch wenig stabilen Substanzen zu tun, bleiben vielfach nach Durchführung einer Reihe notwendiger Trennschritte trotz größerer Mengen ein-

gesetzten Rohproduktes nur sehr geringe Mengen der reinen Substanz schlußendlich zur Strukturaufklärung übrig.

In Anbetracht der oft geringen zur Verfügung stehenden Substanzmengen kommt bei der Strukturaufklärung unbekannter Naturstoffe den spektroskopischen Methoden überragende Bedeutung zu. Vor allem die Massenspektrometrie ist in dieser Beziehung seit etwa 20 Jahren untrennbar mit der Naturstoffchemie verbunden als eine Methode, die mit weniger als einem Milligramm Substanz bei relativ geringen Reinheitsanforderungen Informationen über Molgewicht, Elementarzusammensetzung und Struktur einer unbekannten Substanz liefert³⁾. Im Gegensatz zu den Anfängen der Massenspektrometrie stehen heute eine Reihe spezieller Meßmethoden zur Verfügung, auf die im folgenden Kapitel noch näher eingegangen wird. Anwendung der Felddesorptionstechnik(FD-MS)⁴⁾ erlaubt z.B. die Aufnahme von Massenspektren nichtflüchtiger Verbindungen wie etwa von Zuckern⁵⁾ und bei leichter flüchtigen Verbindungen gelingt durch Verwendung der Kapillar-GC-MS-Kopplung der Nachweis von ng-Mengen einzelner Substanzen in außerordentlich komplexen Naturstoffgemischen⁶⁾. Der Substanzbedarf zur Aufnahme eines NMR-Spektrums, der früher bei etwa 10 mg lag, konnte durch die Entwicklung der Fourier-Transformations-Technik(FT-NMR)⁷⁾ auf weniger als 1 mg gesenkt werden.

Derivatisierungs- und Abbaureaktionen im Mikromaßstab zählen ebenfalls zum Handwerkszeug moderner Strukturermittlung. In Kombination mit den oben erwähnten spektroskopischen Methoden wird eine Ableitung auch sehr schwieriger Strukturen möglich⁸⁾. In zunehmendem Maße wird auch die Röntgenstrukturanalyse zur Strukturermittlung kompliziert gebauter organischer Moleküle eingesetzt, zumal sie das vollständige, dreidimensionale Abbild einer Molekel einschließlich aller geometrischen Parameter liefert.

Da exakte Angaben über Konstitution, Konfiguration und Konformation eines Moleküls im festen Zustand resultieren, muß die Röntgenstrukturanalyse prinzipiell als Methode der Wahl angesehen werden. Einer allgemeinen Anwendung stehen jedoch - neben einem hohen Zeitaufwand - Probleme bei der Kristallisation einzelner Verbindungen und deren "Schweratomderivaten" im Wege⁹⁾.

Die Synthese eines Naturstoffes kann verschieden begründet sein. Läßt die Strukturermittlung eines komplizierten Moleküls mehrere Alternativen offen, so führt erst ein Vergleich mit synthetischem Material zur endgültigen Entscheidung. Bei schwer isolierbaren Naturstoffen oder solchen, die nur in geringer Menge natürlich produziert werden, ist eine Synthese immer dann angezeigt, wenn größere Mengen der Substanz benötigt werden. Dies kann durch ein biologisches, chemisches, medizinisches oder industrielles Interesse bedingt sein. Synthetische Variationen des Naturstoffes sind zum Studium von Struktur-Wirkungsbeziehungen erforderlich¹⁰⁾. Eine weitere Motivation kann im Reiz zur Bewältigung eines schwierigen Syntheseproblems auf rein akademischem Hintergrund liegen. Als Krönung bisheriger Synthesekunst dürfen dabei die Totalsynthesen von Vitamin B12 durch WOODWARD¹¹⁾ sowie des Erythronolids durch COREY¹²⁾ gelten.

1.2. Vorbemerkungen zur Massenspektrometrie

Ein Massenspektrum spiegelt den unimolekularen Zerfall hochangeregter (Radikal-)Kationen in der Gasphase wieder. Das Molekülion wird dabei im allgemeinen durch Elektronenstoß erzeugt und zerfällt in ein "Spektrum" von Tochterionen, die ihrerseits in gleicher Weise zu Folgezerfällen Anlaß geben. Die Überlagerung dieser Prozesse bildet das Massenspektrum des

untersuchten Moleküls¹³⁾. Die Struktur des vermessenen Moleküls kann bekannt oder unbekannt sein. Je nach Ausgangspunkt sind daher mit der Interpretation des betreffenden Massenspektrums unterschiedliche Zielsetzungen verbunden.

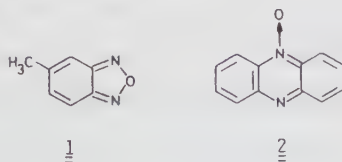
Die Interpretation von Spektren bekannter Verbindungen soll zum Verständnis der betrachteten Prozesse führen. Insbesondere gilt es, den Zusammenhang zwischen der Struktur des Moleküls und dem beobachteten Fragmentierungsverhalten herzustellen und zu rationalisieren. Der großen Vielfalt bereits bekannter Fragmentierungsschritte stehen dabei häufig neue und unerwartete Reaktionen gegenüber. Deren Studium erweitert unsere Erkenntnisse über die Reaktivität angeregter (Radikal-)Kationen in der Gasphase.

Eine vollständige Interpretation setzt voraus, daß Ionenstrukturen, Fragmentierungswege und Fragmentierungsmechanismen aufgeklärt werden. Strenggenommen sind jedoch nur die Fragmentierungswege eindeutig feststellbar (s.u.), während die Strukturen der beobachteten Ionen einer direkten konventionellen Strukturaufklärung nicht zugänglich sind, da sie nicht als Substanz isoliert bzw. chemisch abgefangen werden können. Die Angabe von Ionenstrukturen und Fragmentierungsmechanismen hat demzufolge weitgehenden Postulatcharakter¹⁴⁾. Mit dieser Einschränkung muß die Massenspektrometrie auch heute noch auskommen, obgleich die Möglichkeiten auf diesem Gebiet in jüngster Vergangenheit durch die Entwicklung neuer Untersuchungsverfahren verbessert werden konnten (s.u.). Diese neuen experimentellen Hilfsmittel erlauben immerhin eine Entscheidung darüber, ob eine postulierte Ionenstruktur oder ein Fragmentierungsmechanismus ausgeschlossen werden muß. Hält der Vorschlag dagegen einer derartigen Überprüfung stand,

so ist er damit noch nicht eindeutig als richtig erwiesen.

Massenspektrometrische Fragmentierungsprozesse lassen sich in zwei Gruppen einteilen: Zum einen findet man Fragmentierungswege, die durch sukzessive Abspaltung zusammenhängender Molekülteile zustande kommen, also aus der Struktur des Moleküls im Grundzustand direkt erklärbar sind. Zum anderen existieren aber auch komplexere Prozesse, im Zuge derer Elementkombinationen abgespalten werden, die im Molekül nicht als miteinander verbundene Einheit vorliegen. Diese Reaktionswege sind nur in Verbindung mit Umlagerungen der ursprünglichen Struktur erklärbar¹⁵⁾.

Die Aufklärung derartiger, aus der Struktur des Moleküls zunächst nicht erwarteter Fragmentierungsschritte ist von besonderer Wichtigkeit. Einerseits eröffnen sich hier neue Erkenntnisse zum Reaktionsverhalten des betreffenden Ions in der Gasphase, andererseits sind gerade diese Prozesse von besonderem analytischem Wert, da sie oft charakteristisch für das Vorliegen bestimmter Teilstrukturen innerhalb einer Substanzklasse sind. Dies gilt z.B. für die Abspaltung eines CHO-Radikals aus dem Molekölion von 5-Methylbenzofurazan (1)¹⁶⁾ und die Abspaltung von N₂O aus dem Molekölion von Phenazin-5-oxid (2)¹⁷⁾.



Die Nichtkenntnis derartiger substanzklassenspezifischer Vorgänge kann leicht zu Fehlinterpretationen von Spektren unbekannter Substanzen führen, da die beobachtete Abspaltung das Vorhandensein z.B. einer funktionellen Gruppe vortäuschen kann, die das Molekül aber nicht enthält.

Alle Informationen, die einem Massenspektrum bezüglich der Zerfallsvorgänge entnommen werden können, werden üblicherweise in einem Fragmentierungsschema zusammengefaßt, welches die postulierten Ionenstrukturen und Fragmentierungsmechanismen enthält.

Seit dem Beginn massenspektrometrischer Untersuchungen wurden Vergleiche zwischen MS-Fragmentierung, Thermolyse und Photolyse einer Substanz gezogen. Die Erarbeitung derartiger Zusammenhänge war in jüngerer Zeit Gegenstand zweier umfangreicher Publikationen^{14,18)}. Auch wurden Vergleiche zwischen der sogenannten "Pyrolyse-Gaschromatographie" und der massenspektrometrischen Fragmentierung angestellt¹⁹⁾.

Das Auffinden von Übereinstimmungen oder Unterschieden zwischen den drei Methoden interessiert zunächst aus theoretischer Sicht. Die Reaktivitätsunterschiede in den drei Systemen ergeben sich aus

a) dem elektronischen Anregungszustand,

b) der elektrischen Ladung und

c) dem Energieinhalt sowie der Energieverteilungsfunktion

des reagierenden Teilchens¹⁸⁾. Der Energieinhalt eines Molekülions im 70 eV-Massenspektrum ist wesentlich größer als der Energiebetrag, der dem Molekül im Zuge der herkömmlichen Thermolyse und Photolyse zugeführt werden kann. Da außerdem die Aktivierungsenergien massenspektrometrischer Zerfallsprozesse in der Regel kleiner sind als diejenigen von Thermolyse und Photolyse, zeichnet sich die massenspektrometrische Fragmentierung durch eine geringere Selektivität gegenüber den anderen Methoden aus¹⁸⁾.

Die reagierende Spezies im Massenspektrometer ist ein (Radikal-)Kation, bei den anderen Methoden ein ungeladenes Neutralteilchen. Aus diesem Umstand erwachsen ebenfalls deutliche Unterschiede, die vor allem in Ver-

bindungen mit Heteroatomen zutage treten, da diese zur Stabilisierung positiver Ladungen besonders befähigt sind. Derartige Verbindungen weisen daher oft intensive Fragmentationen im Massenspektrum auf, zu denen kein Thermolyse- bzw. Photolyse-Pendant besteht¹⁸⁾. Auch sterische Unterschiede zwischen Kationen und den entsprechenden Neutralteilchen kommen hier zum Tragen²⁰⁾.

Trotz dieser prinzipiellen Unterschiede sind aber auch auffallende Übereinstimmungen festzustellen. Insbesondere die Abspaltung kleiner Neutramoleküle aus dem Molekülion im Massenspektrometer kann häufig auch als Primärprozeß bei der Thermolyse und Photolyse der untersuchten Substanz wiedergefunden werden. Dies gilt z.B. für die thermische CO-Abspaltung aus Chinonen^{21a)} und Benzoxazinonen²¹⁾ sowie für die photolytische NO-Eliminierung aus Benzofurazan^{22,23)}.

So wird das Massenspektrum in zunehmendem Maße als Entscheidungshilfe herangezogen, wenn es darum geht, ob eine Thermolyse oder Photolyse sinnvollerweise durchgeführt werden soll oder nicht: Sei es, daß man die Wahrscheinlichkeit der Entstehung eines gewünschten Produktes an der relativen Intensität des entsprechenden Fragmentions im Massenspektrum mißt, sei es, daß das Massenspektrum aufgrund unerwarteter intensiver Fragmentationen Anlaß zur Durchführung einer Thermolyse oder Photolyse gibt, in der Hoffnung, diese unerwartete Reaktion präparativ nachvollziehen zu können²⁴⁻²⁶⁾.

Der analytische Wert eines Massenspektrums bei der Strukturaufklärung unbekannter Verbindungen ergibt sich - neben der Bestimmbarkeit von Molgewicht und Elementarzusammensetzung - aus der Möglichkeit, Strukturinformationen aus der MS-Fragmentierung zu gewinnen. Bei annelierten cyclischen Strukturen kommt man durch Anwendung der allgemeinen Fragmentierungsregeln

allein häufig nicht zum Ziel. Es bedarf hier der Kenntnis prinzipiell für einzelne Substanzklassen zu erwartender Fragmentierungswege. Diese Kenntnis muß empirisch gewonnen werden, indem eine möglichst große Anzahl von bekannten Verbindungen der infrage kommenden Substanzklasse zunächst vermessen wird. Die Interpretation dieser Spektren resultiert dann in der Aufstellung von Fragmentierungsschemata, in die der MS-Zerfall der unbekannten Verbindung später eingeordnet und so deren Struktur zumindest teilweise festgelegt werden kann.

Die Interpretation von Spektren bekannter Verbindungen einzelner spezieller Verbindungsklassen - so muß als Fazit festgehalten werden - ist in zweifacher Hinsicht wichtige Grundlage: zum einen resultieren neue Erkenntnisse über massenspektrometrische Reaktionsabläufe, zum anderen kann nur auf diesem Wege dem Analytiker das erforderliche Rüstzeug an die Hand gegeben werden, um ihm eine Strukturermittlung unbekannter Verbindungen dieser Verbindungsklassen mittels Massenspektrometrie zu ermöglichen. Die Methode erweist sich dabei als einsatzfähig, obwohl - wie oben ausgeführt - Ionenstrukturen und Fragmentierungsmechanismen in manchen Fällen nur postuliert werden können.

1.3. Spezielle massenspektrometrische Untersuchungsverfahren

1.3.1. Metastabile Signale

Massenspektren zeigen in vielen Fällen zusätzlich zu den "normalen" Fragmenten sogenannte "metastabile Signale", die an ihrer verbreiterten Form erkennbar sind. Sie entstehen, wenn der Zerfall "normaler" Fragmente (oder des Molekülions) erst nach dem Verlassen der Ionenquelle (oder des elektrischen Sektors) und vor Eintritt in das Magnetfeld des Massenspektrometers erfolgt²⁷⁾. Aus der Lage dieser Signale im Spektrum ist in den meisten

Fällen wertvolle Information bezüglich der Fragmentierungswege zu gewinnen, da in der Regel jedem metastabilen Signal ein Mutterion/Tochterion-Paar zugeordnet werden kann. Allerdings muß dieser Zerfallsprozeß nicht unbedingt einstufig verlaufen. Wenn in einem zweistufigen Prozeß ein langsamer Reaktionsschritt von einem schnellen gefolgt wird, kann ein metastabiles Signal für die Gesamtfragmentierung beobachtet werden²⁸⁾.

Bei doppelfokussierenden Geräten ist es durch Anwendung spezieller Meßtechniken möglich, isoliert von der Aufnahme eines "normalen" Spektrums ausgesprochene "Metastabilen-Spektren" zu registrieren, deren Informationsgehalt noch wesentlich höher liegt. Denn durch spezielle Scanfunktionen der Ionenbeschleunigungsspannung und der Spannung zwischen den Platten des elektrischen Sektors (Ablenkspannung) gelingt es, ausschließlich die Zerfälle in bestimmten Abschnitten der Ionenflugbahn außerhalb des elektrischen und magnetischen Feldes zu erfassen:

1. Beim Vorliegen einer "normalen" Geometrie (elektrischer Sektor vor dem magnetischen Sektor) untersucht man die Zerfälle zwischen Ionenquelle und elektrischem Sektor durch Anwendung der IKE-technik (ion kinetic energy spectra)²⁹⁾, der Defokussierungsmethode³⁰⁾ sowie in jüngster Zeit mittels des "linked scan"-Verfahrens³¹⁾.

2. Beim Vorliegen einer "inversen" Geometrie (magnetischer Sektor vor dem elektrischen Sektor) untersucht man die Zerfälle zwischen Magnetfeld und dem elektrischen Sektor. Dieses Verfahren trägt die Abkürzung MIKE (mass analyzed ion kinetic energy spectra)³²⁾ oder neuerdings auch DADI (direct analysis of daughter ions)³³⁾.

Je nach angewendetem Verfahren erhält man unterschiedliche Informationen: Das DADI- sowie das "linked scan"-Spektrum sagen aus, welche Tochterionen

durch Zerfall eines einzelnen untersuchten Mutterions entstehen, während mittels der Defokussierungstechnik die möglichen Mutterionen eines untersuchten Tochterions detektiert werden. Darüberhinaus lassen sich aus Form und Breite der Signale in diesen Metastabilen-Spektren - außer beim linked scan - Rückschlüsse auf die energetischen Verhältnisse beim zugehörigen Fragmentierungsprozeß ziehen³⁴⁾. Die DADI-Technik hat sich als besonders hilfreich bei der Aufstellung von Fragmentierungsschemata erwiesen, da die in metastabilem Übergang gebildeten Folgeionen aller signifikanten Fragmente eines normalen Spektrums mit ihrer Hilfe zweifelsfrei ermittelt werden können³⁵⁾.

1.3.2. CA(collisional activation)-Spektren

Ein in jüngster Vergangenheit in zunehmendem Maße auf strukturanalytische Probleme angewandtes massenspektrometrisches Meßverfahren stellt die sogenannte CA-Spektrometrie (von collisional activation=Stoßaktivierung) dar³⁶⁾. Wie bei der DADI-Technik wird zunächst ein Ion beliebiger Masse durch das Magnetfeld selektiert. Nach Verlassen des Magnetfeldes und vor Eintritt in den elektrischen Sektor wird ein Teil seiner kinetischen Energie durch Stoß mit einem inerten Gas in Anregungsenergie umgewandelt. Der anschließende Zerfall dieses durch "Stoßaktivierung" angeregten Ions läßt praktisch ein "Massenspektrum" dieses Fragmentes im feldfreien Raum vor dem elektrischen Sektor entstehen, das als sog. CA-Spektrum in gleicher Weise wie das DADI-Spektrum zur Registrierung gelangt. Es ist - wie ein normales Massenspektrum für die Struktur eines Moleküls - charakteristisch für die Struktur des untersuchten Fragmentions. Ein Strukturvorschlag für dieses Fragment kann daher durch einen Vergleich mit dem CA-Spektrum eines Referenzions bekannter Struktur auf seine Richtigkeit überprüft werden³⁷⁾.

Aufgrund des begrenzten Auflösungsvermögens erfolgt die Aufnahme von DADI-CA-Spektren nur bis zu einer Masse des Mutterions von ca. 150 ME. CA-Spektren können aber auch im Zusammenhang mit der linked-scan-Technik aufgenommen werden, die wegen der wesentlich höheren Auflösung auch für die Untersuchung von Ionen größerer Masse geeignet ist³⁸⁾.

1.3.3. Massenspektren isotoopenmarkierter Verbindungen

Ein wichtiges Hilfsmittel, um Einblicke in Fragmentierungsmechanismen und Ionenstrukturen zu gewinnen, ist die Aufnahme von Massenspektren spezifisch isotoopenmarkierter Verbindungen³⁹⁾. Da der Isotopengehalt im Massenspektrum direkt "sichtbar" wird, ist keine besondere Isotoopenanalyse erforderlich. Durch Vergleich des Isotopengehaltes von Mutterion und Tochterion läßt sich eine Aussage darüber machen, welche Atome an einem untersuchten Fragmentierungsschritt beteiligt sind. Aus diesem Befund sind Rückschlüsse auf Mechanismen und Ionenstrukturen möglich. Eine eindeutige Aussage kann insbesondere dann gemacht werden, wenn das Mutterion in der gewünschten Position isotoopenmarkiert ist und das Tochterion diese Markierung entweder noch vollständig enthält oder völlig verloren hat. Ein solcher Fall liegt z.B. bei der sog. "Mc-Lafferty-Umlagerung" vor⁴⁰⁾.

Liegt der Markierungsverlust im Zuge eines Fragmentierungsprozesses dagegen bei einem Wert ungleich 0 oder 100 Prozent, so kann dieser Sachverhalt verschiedene Gründe haben:

1. Es können verschiedene Konkurrenzmechanismen unter Beteiligung verschiedener Atome zur Genese des Tochterions beitragen.
2. Durch reversible Isomerisierungsreaktionen kommt es zu einer Gleichverteilung der Markierung über verschiedene Positionen des Mutterions, bevor die Fragmentierungsreaktion abläuft ("scrambling")⁴¹⁾.

3. Die Fragmentierung findet aus einer umgelagerten Struktur des Mutterions heraus statt, wobei die Abspaltung unter Beteiligung sowohl eines markierten wie auch eines unmarkierten Atoms der gleichen Atomsorte nebeneinander ablaufen kann⁴²⁾.

4. Die Struktur des Mutterions ist nicht einheitlich, sondern es liegen mehrere nicht ineinander überführbare Isomere vor.

Es können daher u.U. mehr Atome einer bestimmten Atomsorte am untersuchten Fragmentierungsschritt beteiligt sein, als es die Summenformel des abgespaltenen Teilchens erfordert. Durch sukzessive Markierung weiterer infrage kommender Positionen läßt sich dieser Befund dann untermauern. Weitere Informationen sind durch die Aufnahme von Metastabilen-Spektren (s.o.) isotopenmarkierter Verbindungen zu gewinnen⁴³⁾. Trotz gelegentlich auftretender Interpretationsschwierigkeiten - zu denen auch das Auftreten von Isotopeneffekten beitragen kann⁴⁴⁾ - bleiben jedoch die Spektren isotopenmarkierter Verbindungen bei der Erforschung von Reaktionsmechanismen und Ionenstrukturen eine Hauptinformationsquelle.

1.4. Ausgangspunkt und Ziele der vorliegenden Arbeit

Die Actinomyceten werden als Produzenten von Antibiotika mit großer Strukturvielfalt von keiner anderen Gruppe von Mikroorganismen übertroffen⁴⁵⁾.

Diese Eigenschaft macht sie zum bevorzugten Untersuchungsobjekt einiger mikrobiologischer Arbeitsgruppen, die sich vornehmlich mit der Suche nach neuen Antibiotika beschäftigen. Aufgrund der Vielzahl bereits bekannter antibiotisch wirksamer Metabolite aus Actinomyceten ist jedoch heute das Risiko relativ groß, auch bei der Untersuchung der Stoffwechselprodukte eines neuen Stammes ausschließlich auf bereits bekannte Substanzen zu stoßen. Da die Isolierung der einzelnen Metabolite zunächst vielfach mehrstufige

Trennungsgänge erfordert, bevor eine Aussage darüber gemacht werden kann, ob die betreffende Substanz neu ist, geht man das Risiko hoher Zeitverluste ein. Die "Trefferquote" zur Auffindung neuer Verbindungen läßt sich erheblich steigern, indem man das Screening-Verfahren bei der Auswahl der zu untersuchenden Stämme auf spezielle biochemische Eigenschaften von Metaboliten auslegt. Diese Methodik wurde in der Arbeitsgruppe von ZÄHNER entwickelt⁴⁶⁾. Nach wie vor muß aber damit gerechnet werden, daß schließlich "nur" neue biologische Eigenschaften bereits beschriebener Substanzen aufgefunden werden.

ZÄHNER et al. hatten aus einer afrikanischen Bodenprobe den Streptomycesstamm Tü 1074 isoliert, dessen Eigenschaften mit dem bereits früher beschriebenen Streptomyces michiganensis übereinstimmen⁴⁷⁾. Die Kulturlösung zeichnet sich durch hohe antibiotische Wirkung gegen Bacillus subtilis ATCC 6051 auf einem definierten Nährmedium aus. Nach Extraktion der Lösung und chromatographischer Vortrennung erhielt man als antibiotisch wirksames Rohprodukt ein rot-violettes, komplex zusammengesetztes Pigmentgemisch, dessen Farbe und biologische Aktivität stark von der Wahl der Fermentationsbedingungen abhing (Belüftung und pH-Wert der Kultur): Beim "Standardverfahren" wurde auf maximale antibiotische Aktivität optimiert; dabei überwog die violette Farbkomponente. Wurde dagegen auf maximale Produktion der roten Farbkomponente optimiert ("optimiertes Verfahren"), erwies sich das Rohprodukt als biologisch inaktiv (Abb.1 u.2, S.14).

Es zeichnete sich demnach ab, daß die antibiotische Aktivität des Rohproduktes auf Farbstoffe zurückzuführen sein würde. Wir stellten uns daher die Aufgabe, die Hauptpigmente aus dem Rohprodukt in reiner Form zu isolieren und zu prüfen, welches von ihnen - soweit sich die obige Annahme als richtig

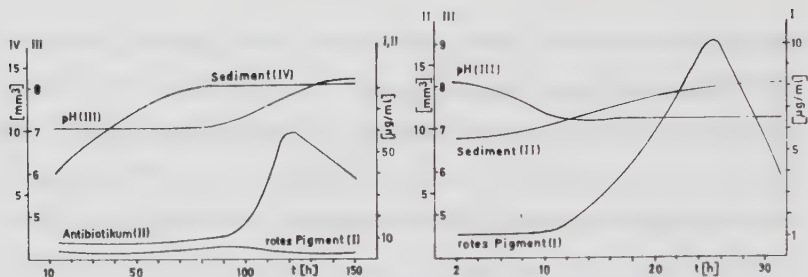


Abb.1(links): Standardfermentation von Streptomyces michiganensis Tü 1074 im 10-l-Fermenter. Verlauf der Bildung des roten Pigmentes (I), der Antibiotikaproduktion (II), des pH-Wertes (III) und der Sedimentbildung (IV)

Abb.2(rechts): Fermentation von S.michiganensis im 10-l-Fermenter nach dem optimierten Verfahren. Verlauf der Bildung des roten Pigmentes (I), der Sedimentbildung (II) und des pH-Wertes (III). Antibiotische Wirkung war nicht nachweisbar.

erweisen sollte - der Träger des antibiotischen Prinzips ist. Darüberhinaus sollte die Struktur dieser Pigmente aufgeklärt werden, zumal in Verbindung mit der hohen antibiotischen Aktivität das Vorliegen einer neuen Verbindung vermutet wurde.

Nach Vorversuchen erwies sich, daß die Isolierung der gesuchten Verbindungen durch zwei Faktoren erschwert sein würde:

1. Trotz Optimierung der Fermentationsbedingungen lagen die Farbstoffe nur in geringer Konzentration in einem komplexen Gemisch mit anderen Inhaltsstoffen vor (Rohprodukt).
2. Bereits beim Lagern des Rohproduktes im Kühlschrank wird ein schneller Abfall der antibiotischen Wirkung festgestellt. Das Antibiotikum ist also offensichtlich im Gemisch mit den anderen im Rohprodukt enthaltenen Verbindungen instabil. Die Aufarbeitung des Rohproduktes auf reines Antibiotikum mußte daher so schnell und schonend wie möglich erfolgen, denn während der

Reinigung ist mit einer fortschreitenden Zersetzung zu rechnen. Auf Aluminiumoxidsäulen wurde besonders rapide Zersetzung beobachtet⁴⁸⁾.

Zur Isolierung der Pigmente war also eine Kombination chromatographischer Trennungen ohne Verwendung von Aluminiumoxid anzuwenden. Zur Strukturermittlung war in erster Linie (aufgrund der geringen zu erwartenden Mengen an Reinsubstanzen) an spektroskopische Verfahren in Kombination mit Abbau- und Derivatisierungsversuchen im Mikromaßstab zu denken. Diese Methodik wurde in unserer Arbeitsgruppe wiederholt zur Isolierung und Strukturermittlung von Stoffwechselprodukten aus Mikroorganismen angewendet^{8,49)}.

Nach Abschluß dieses Teiles der Arbeit weckten Besonderheiten im Massenspektrum eines der Hauptpigmente - eines in der Literatur noch nicht beschriebenen und von uns "Michigazon" genannten Phenoxazons - unser Interesse. Über die MS-Fragmentierung von Phenoxazonen ist nur wenig bekannt: 1977 erschien eine Publikation mit der Aufstellung eines Fragmentierungsschemas für den Grundkörper - das unsubstituierte Phenoxazon - sowie einige Benzophenoxazone⁵⁰⁾. Bis zu diesem Zeitpunkt war lediglich ein Vorschlag für das Zerfallsschema von 2-Aminophenoxazon publiziert⁵¹⁾. Als nahe verwandt sind Phenoxazine, Phenothiazine und Phenazine anzusehen, deren massenspektrometrische Fragmentierung etwas ausführlicher beschrieben ist⁵²⁻⁶⁴⁾.

Das Auftreten eines unerwarteten Fragmentierungsprozesses im Spektrum von Michigazon (Abspaltung von H_2O aus dem Molekölion) - was die Strukturarbeiten anfangs behinderte -, die Nichtverfügbarkeit massenspektrometrischer Daten über unterschiedlich substituierte Phenoxazone in der Literatur und die in den Vorbemerkungen zur Massenspektrometrie aufgeführten allgemeinen Gründe haben uns zu folgender Aufgabenstellung veranlaßt:

1. Die massenspektrometrische Abspaltung von Wasser aus dem Molekölion des Michigazons sollte interpretiert werden; es sollten Argumente für eine Diskussion des Fragmentierungsmechanismus gewonnen und eine Struktur für das Ion bei M-18ME angegeben und weitgehend abgesichert werden.
2. Für das Massenspektrum von Michigazon sollte ein Fragmentierungsschema ausgearbeitet werden.
3. Die Massenspektren weiterer, insbesondere hydroxy- und methoxysubstituierter Phenoxazone sollten aufgenommen und interpretiert werden; die Zusammenhänge zwischen Strukturveränderungen und korrespondierenden Änderungen des massenspektrometrischen Fragmentierungsverhaltens sollten erkannt und formuliert werden.
4. Michigazon und die weiteren zu der massenspektrometrischen Untersuchung erforderlichen und geeigneten Phenoxazone - überwiegend in der Literatur nicht beschrieben - mußten synthetisiert werden.
Für das Studium von Fragmentierungsmechanismen war die Synthese geeigneter isotoopenmarkierter Phenoxazone erforderlich.

Die massenspektrometrische Analyse mußte sich neben der Untersuchung der isotoopenmarkierten Substanzen auf hochaufgelöste Messungen (Elementarzusammensetzung) und die Beobachtung metastabiler Signale im "normalen" Massenspektrum (Fragmentierungswege) stützen. Neuere Methoden wie DADI- oder CA-Spektroskopie sind uns derzeit in Freiburg noch nicht zugänglich.

2. ALLGEMEINER TEIL

2.1. Isolierung des violetten Pigmentes

Die Fermentation des Streptomycesstammes Tü 1074 (S.michiganensis) sowie die anschließende Chloroformextraktion der Kulturlösung (Kulturfiltrat) wurden von Frau Dr.G.Wolf in der Arbeitsgruppe von Prof.Dr. H.Zähner (Institut für Biologie II, Lehrbereich Mikrobiologie I an der Universität Tübingen) durchgeführt.

Zur Isolierung des antibiotischen Prinzips, das zusammen mit einer violetten Farbkomponente bei der Fermentation nach dem "Standardverfahren" gebildet wurde, standen als Rohprodukt ca. 9 ml Chloroformextrakt von honigartiger Konsistenz - gewonnen aus einer 200-l-Fermentation - zur Verfügung. Nach Verdünnung dieses Extraktes mit Methanol und Abtrennung einer geringen Menge ungelösten Rückstandes wurde die abfiltrierte Lösung durch 5 chromatographische Trennoperationen fraktioniert, die in Abb.3 zusammengefaßt sind. Die antibiotisch aktiven Fraktionen jeder Säulenchromatographie mußten vereinigt und dem folgenden Trennschritt unterzogen werden, während die inaktiven Fraktionen verworfen wurden. Die Detektion der aktiven Fraktionen gestaltete sich bei den ersten beiden Säulenchromatographien an Sephadex und Merckogel schwierig: Da eine sichere chemische Detektion nicht möglich war (daß es sich bei dem Antibiotikum um eine violett gefärbte Substanz handelt, war zunächst nur eine Vermutung), mußte biologisch detektiert werden. Außerdem war eine scharfe violette Bande, die zumindest als Orientierung hätte dienen können, auf der Säule nicht zu erkennen.

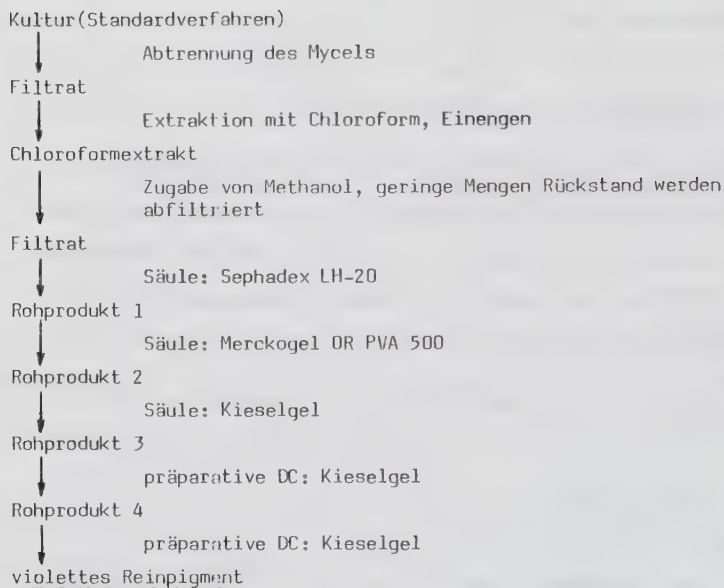


Abb.3: Trennungsgang zur Isolierung des violetten Pigmentes

Die biologische Detektion kann auf zwei Wegen erfolgen:

1. Eine Filterrondelle wird mit einem aliquoten Anteil jeder Fraktion der Säulenchromatographie getränkt und anschließend getrocknet. Diese Rondellen werden auf einen Nährboden, der mit dem Testorganismus beimpft ist, aufgelegt. Durch Diffusion der antibiotisch aktiven Substanz in den Nährboden wird das Wachstum des Testorganismus im Umkreis um die betreffende Filterrondelle gehemmt, womit die gesuchten Fraktionen aufgefunden werden können (Plattendiffusionstest)⁽⁶⁵⁾.
2. Dieses Verfahren läßt sich auch mit entwickelten Dünnschichtchromatogrammen durchführen, die zur Kontrolle der Säulenfraktionen angefertigt werden (Bioautogramm)⁽⁶⁶⁾. Dadurch ist es möglich, die durch DC getrennten

Substanzen einer Säulenfraktion einzeln auf antibiotische Wirksamkeit zu testen.

In unserem Falle war der Plattendiffusionstest das Verfahren der Wahl, da die biologischen Tests in Tübingen durchgeführt wurden und die präparierten Filterrondellen problemlos verschickt werden konnten. Auf diese Weise konnten die interessierenden Fraktionen zweifelsfrei identifiziert werden.

Während der Säulenchromatographie an Kieselgel wurde eine Bande mit violetter Farbe sichtbar. Der Plattendiffusionstest bestätigte nun die eingangs aufgestellte Hypothese: die violett gefärbten Fraktionen waren aktiv, die übrigen Fraktionen inaktiv. Allerdings erwies sich die violette Bande im DC immer noch als Gemisch, bestehend aus einer scharf abgegrenzten violetten Zone und mehreren farblosen Zonen, die im UV-Licht bzw. durch Anfärbung mit Jod sichtbar gemacht werden konnten. Es schlossen sich daher noch zwei weitere Reinigungsschritte unter Anwendung der präparativen DC an, so daß das reine violette Pigment schließlich in einer Menge von nur 0,4 mg (!) erhalten werden konnte. Eine Lösung dieser Substanz hemmt noch in hoher Verdünnung das Wachstum von Bacillus subtilis.

Es war bekannt, daß der Chloroformextrakt bereits nach wenigen Tagen Aufbewahrung im Kühlschrank einen starken Aktivitätsabfall erleidet (siehe Einleitung). Als wir den Extrakt in Händen hatten, war die Zersetzung des Antibiotikums offensichtlich bereits so weit fortgeschritten, daß eine violette Farbbande im Zuge der ersten säulenchromatographischen Trennoperationen infolge einer Überdeckung durch mehrere braun gefärbte Zonen nicht mehr erkannt werden konnte. So ist auch die sehr geringe Menge des in reiner Form isolierten Antibiotikums im Vergleich zu dessen errechnetem Gehalt in der Kulturlösung (Diffusionstest) zu erklären, zumal eine weitere

Zersetzung bei der Reinigung auch durch den Einsatz schonender chromatographischer Verfahren nicht völlig unterdrückt werden kann. Hinzu kommt, daß die aktiven Fraktionen der ersten und zweiten Säulenchromatographie nicht weiterverarbeitet werden konnten, bevor das Ergebnis der biologischen Tests vorlag. Dieser unvermeidbare Zeitverlust mußte wegen der Zersetzlichkeit der Substanz ebenfalls zu einer Verringerung der Endausbeute führen. Das reine Pigment ließ sich dagegen ohne Aktivitätsverlust längere Zeit im Kühlschrank aufbewahren.

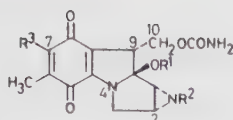
2.2. Ermittlung der Struktur des violetten Pigmentes

Trotz der geringen zur Verfügung stehenden Menge von nur 0.4 mg gelang die Identifizierung der Verbindung durch Elektronen- und Massenspektroskopie sowie durch das Heranziehen von Vergleichssubstanzen.

2.2.1. Elektronenspektrum

Das Elektronenspektrum zeigt in Methanol Maxima bei 316 nm und 518 nm. Diese Absorption läßt sich mit dem Chromophor der Mitomycine A und B korrelieren⁶⁷⁾. Mitomycine sind als antibiotisch aktive Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen bekannt. Abb.4 gibt eine Übersicht über die aus Streptomyces caespitosus und S.verticillatus isolierten Vertreter dieser Substanzklasse⁶⁸⁾.

Zur Strukturaufklärung der kompliziert gebauten Mitomycine waren Abbauexperimente erforderlich⁶⁸⁾. Sollte sich die von uns isolierte Substanz als neues Mitomycin erweisen, waren Strukturarbeiten nur nach Isolierung wesentlich größerer Substanzmengen möglich. Um diese Frage zu klären, war zunächst die exakte Bestimmung des Molgewichtes erforderlich, die bei der zur Verfügung stehenden Menge an Substanz nur massenspektrometrisch erfolgen konnte.



Mitomycin A (3)	$R^1=CH_3$	$R^2=H$	$R^3=OCH_3$	Molgewicht: 349
Mitomycin B (4)	$R^1=H$	$R^2=CH_3$	$R^3=OCH_3$	" : 349
Mitomycin C (5)	$R^1=CH_3$	$R^2=H$	$R^3=NH_2$	" : 334
Porfiromycin (6)	$R^1=CH_3$	$R^2=CH_3$	$R^3=NH_2$	" : 348

Abb.4: natürlich vorkommende Mitomycine nach ⁽⁶⁸⁾ (absol.Konfig. ⁽⁶⁹⁾)

2.2.2. Massenspektren

Obgleich andere Autoren über elektronenstoßinduzierte Massenspektren von Mitomycinen berichtet haben ⁽⁷⁰⁾, gelang uns die Aufnahme eines konventionellen Spektrums nicht, da sich die Substanz offenbar beim Aufheizen im Gerät zersetzt. Derartige Verbindungen sind für die Aufnahme eines Feld-desorptionsspektrums (FD-MS) ⁽⁴⁾ prädestiniert. Diese neuere Methode erlaubt es, Massenspektren schwer flüchtiger und bei höheren Temperaturen zersetzlicher Verbindungen bei niedrigen Temperaturen ohne vorhergehende Verdampfung aufzunehmen. Im Gegensatz zur normalen Elektronenstoß-Massenspektrometrie (EI-MS) erhält man in der Regel ausschließlich das Molekülion (oder das durch H-Anlagerung entstehende Ion $M+1ME$) einer Substanz mit hoher Intensität. Zur Molekulargewichtsbestimmung kleiner Mengen einer schwerflüchtigen Substanz ist dies daher die Methode der Wahl.

Das Molekülion unseres violetten Pigmentes trat im FD-Spektrum bei m/e 349 auf. Damit ist das Molgewicht identisch mit dem von Mitomycin A oder B und die Chance gering, daß im violetten Pigment ein neues Mitomycin vorliegt. Um sicher zu gehen, mußte die Elementarzusammensetzung des Moleküls ermittelt werden. Während dies im EI-Spektrum durch "peak matching"

mit einem Referenzfragment des Perfluorkerosins problemlos durchgeführt werden kann⁷¹⁾, kann im FD-Spektrum nur das Molekülion einer zweiten Substanz als Referenzmasse herangezogen werden, die etwa bei der gleichen Meßtemperatur ein Spektrum liefert und deren Molgewicht nicht mehr als 10% vom Molgewicht der unbekannten Substanz abweicht⁷²⁾. Im Falle des violetten Pigmentes konnte dieses Problem durch hochaufgelöste Messung eines Gemisches von violettem Pigment und Mitomycin C (authentisch aus Tübingen) gelöst werden, indem das Molekülion von Mitomycin C bei m/e 334.1277 ($C_{15}H_{18}N_4O_5$) als Referenzmasse für das peak-matching verwendet wurde. Für das Molekülion des violetten Pigmentes ergab sich auf diesem Wege die exakte Masse 349.1200, entsprechend einer Elementarzusammensetzung von $C_{16}H_{19}N_3O_6$. Auch dieser Befund ist in Übereinstimmung mit dem Vorliegen von Mitomycin A oder B (Abb.4).

2.2.3. Vergleich mit authentischem Mitomycin A

Der Vergleich des violetten Pigmentes mit authentischem Mitomycin A (aus Tübingen) ergab identische UV-Spektren und identisches DC-Verhalten in zwei verschiedenen Laufmitteln. Offensichtlich handelt es sich demnach bei dem von uns isolierten violetten Pigment um das bekannte Antibiotikum Mitomycin A, dessen Vorkommen als Stoffwechselprodukt von Streptomyces michiganensis allerdings bisher nicht bekannt war.

2.3. Isolierung des roten Pigmentes

Durch eine Erhöhung der Luftzufuhr und des pH-Wertes konnte die Produktion einer roten Farbkomponente bei der Fermentation gesteigert werden, deren Bildung anhand einer Absorptionsbande bei 380 nm im Elektronenspektrum auch quantitativ verfolgt wurde ("optimiertes Verfahren"). Ursprünglich war vermutet worden, daß auch diese Komponente antibiotisch aktiv sei; dann stellte man jedoch fest, daß bei optimaler Produktion dieses Farbstoffes die Kulturlösung antibiotisch inaktiv war und auch kein violettes Pigment mehr gebildet wurde. Trotzdem war die Isolierung und Strukturermittlung des roten Farbstoffes ebenfalls von Interesse, da sich die Frage stellte, ob eine chemische Verwandtschaft zu den Mitomycinen besteht.

Zur Isolierung des roten Pigmentes standen 300 mg Rohprodukt zur Verfügung, das nach Chloroformextraktion des Kulturfiltrates und Vortrennung auf einer Aluminiumoxidsäule (in Tübingen) aus 30 l Kulturlösung nach dem optimierten Verfahren gewonnen worden war. Im Gegensatz zu Mitomycin A erwies sich das rote Pigment unter den Bedingungen der Aufarbeitung und Vortrennung als stabil, wodurch es problemlos zu handhaben war. Der gesamte Trennungsgang bis zur Isolierung der reinen Verbindung ist in Abb.5 dargestellt.

Nach zweimaliger Chromatographie an Sephadex (die Wanderung des roten Farbstoffes war jeweils auf der Säule gut zu erkennen) erhielten wir zwar eine Anreicherung des Pigmentes, jedoch lag es noch in einem komplexen Gemisch vor, wie das Gaschromatogramm der Pigmentfraktion beweist (Abb.6).

Bei Lösungsversuchen in verschiedenen Lösungsmitteln konnte mit Ether ein überraschend glatter Trennerfolg erzielt werden: sämtliche Verunreinigungen (allerdings auch ein geringer Anteil an rotem Pigment) gingen in Lösung, während das rote Pigment selbst als ungelöster Rückstand verblieb.

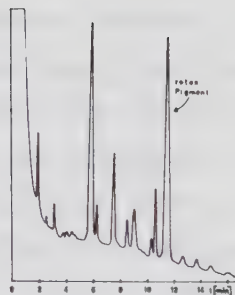
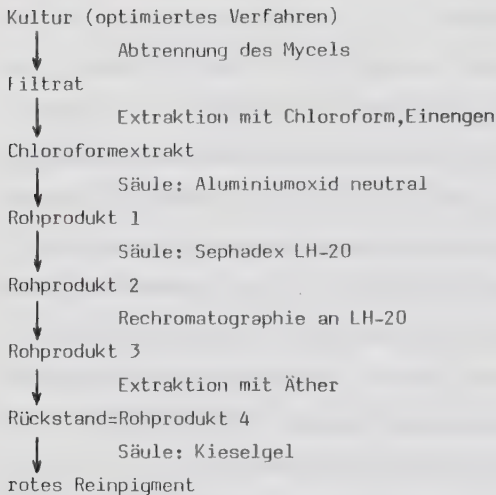


Abb.6: Gaschromatogramm des Rohproduktes 3 (vgl. Abb.5)

Abb.5: Trennungsgang zur Isolierung des roten Pigmentes

Zur Abtrennung der letzten Reste an Begleitsubstanzen wurde eine abschließende Säulenchromatographie an Kieselgel durchgeführt. Das rote Pigment konnte auf diesem Wege in einer Menge von 30 mg in reiner Form isoliert werden. Die Substanz ist gut löslich in DMSO und Pyridin, weniger gut in Chloroform und relativ schlecht in anderen organischen Lösungsmitteln. Aus methanolischer Lösung erhielten wir orangerote Kristallbüschel vom Schmp. 211-213⁰ C.

2.4. Strukturermittlung des roten Pigmentes

2.4.1. Massenspektrum

Das Massenspektrum des roten Pigmentes ist in Abb.7 wiedergegeben. Für das Moleküllion bei m/e 287 ermittelt man durch hochaufgelöste Messung die Elementarzusammensetzung C₁₅H₁₃NO₅. Das Spektrum spricht aufgrund des intensiven Moleküllions (base peak) und der relativ geringen Fragmentierungs-

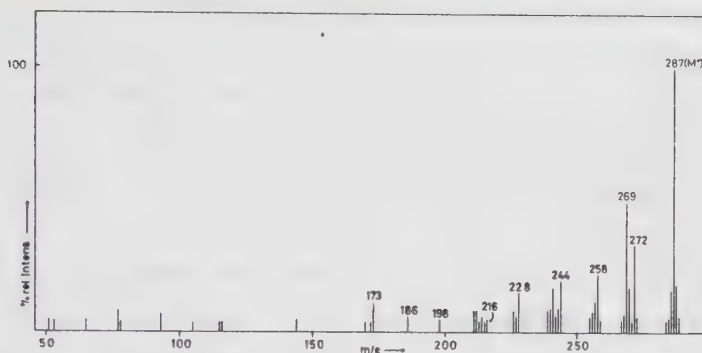


Abb.7: Massenspektrum des roten Pigmentes

tendenz für das Vorliegen eines konjugierten Ringsystems⁷³⁾. Das gefundene Kohlenstoff-Wasserstoffverhältnis unterstützt diesen Befund.

Bevorzugt werden $15\text{ME}(\text{CH}_3)$ und $18\text{ME}(\text{H}_2\text{O})$ - letzteres in metastabilem Übergang - aus dem Molekulation abgespalten. Während die Abspaltung eines Methylradikals ein wenig spezifischer Prozeß ist, der in den Massenspektren sehr vieler Verbindungen mit Methylgruppen auftritt, wird die Abspaltung von Wasser - insbesondere unter Erzeugung eines Fragmentes von signifikanter Intensität - im allgemeinen nur bei Vorliegen einer freien OH-Gruppe im Molekül beobachtet⁷⁴⁾. Darüberhinaus ist bekannt, daß nicht alle OH-Gruppen Anlaß zu einem solchen Fragmentierungsprozeß geben; phenolische Hydroxyfunktionen verursachen z.B. eine Fragmentierungsreaktion, im Zuge derer $28\text{ME}(\text{CO})$ abgespalten werden⁷⁵⁾. Weitere Strukturdetails können dem Spektrum des roten Pigmentes nicht mit Sicherheit entnommen werden, so daß seine Aussagekraft für die Strukturermittlung insgesamt gering bleibt.

Nach Behandlung mit Methan $[D]$ -ol läßt sich im MS - wie beim Vorliegen einer Hydroxygruppe zu erwarten - ein austauschbares Proton feststellen.

Sehr überraschend war dagegen die Beobachtung, daß dieses Proton an der ausgeprägten Wassereliminierung aus dem Molekülion nicht beteiligt ist: das Fragment bei M-18ME enthält noch die volle Deuterium-Markierung!

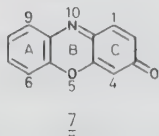
Diese widersprüchlichen Ergebnisse führen zu den folgenden Schlußfolgerungen:

1. Da nur ein einziges austauschbares Proton im Molekül vorliegt, enthält die Struktur eine (und nur eine) OH- oder NH-Funktion.
2. Liegt eine OH-Funktion vor, so ist diese an der Wassereliminierung aus dem Molekülion nicht beteiligt.
3. Liegt eine NH-Funktion vor, so müssen wegen des Fehlens einer OH-Gruppe ebenfalls andere funktionelle Gruppen die an der Wasserabspaltung beteiligten Atome beisteuern.

Die massenspektrometrische Fragmentierung des roten Pigmentes war vor diesem Hintergrund Gegenstand einer eingehenden Untersuchung, über die später ausführlich berichtet wird.

2.4.2. Elektronen- und IR-Spektrum

Das rote Pigment besitzt Elektronen- und IR-Spektren (Abb. 8 und 9), die mit dem Grundgerüst eines Phenoxazons (7=unsubstituiertes Phenoxazon) gut korrelierbar sind. Für das Elektronenspektrum eines Phenoxazons ist das



Vorliegen von vier Banden bei 230 nm, 250-275 nm, 345-365 nm und 430-450 nm charakteristisch⁷⁶⁾. Die bathochrome Verschiebung der beiden letztgenannten Banden im Spektrum des roten Pigmentes muß auf Substituenten am Ringsystem zurückgeführt werden. Nach

Abzug der Elementarzusammensetzung von $C_{12}H_7NO_2$ (für den unsubstituierten Grundkörper) von derjenigen des roten Pigmentes verbleibt für diese Substituenten insgesamt die Elementarzusammensetzung $C_3H_6O_3$.

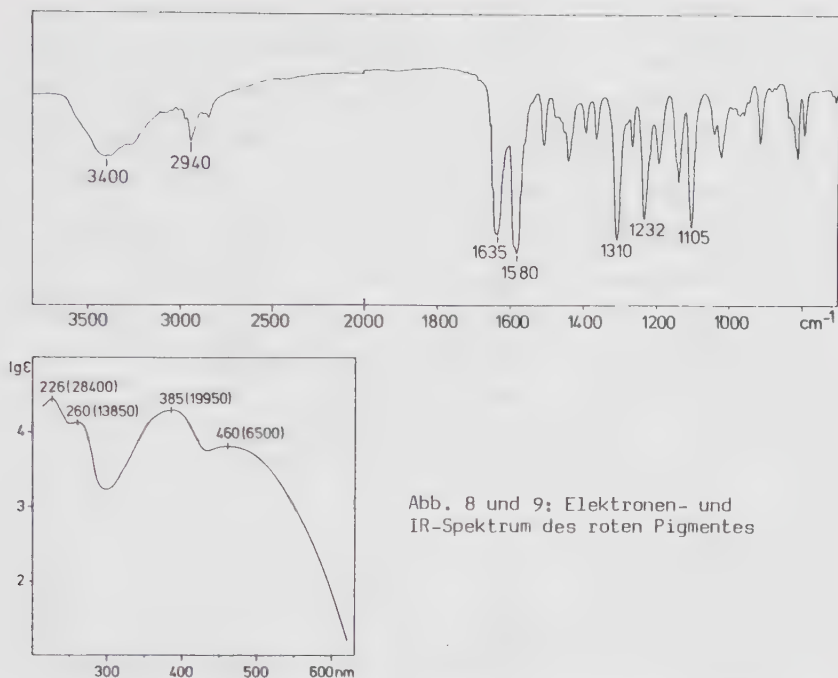
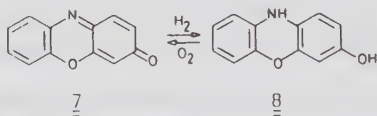


Abb. 8 und 9: Elektronen- und IR-Spektrum des roten Pigmentes

Die IR-Spektren der Phenoxazone weisen charakteristische intensive Absorptionsbanden zwischen 1500 und 1700 cm^{-1} auf^{76c,77}). Das Spektrum des roten Pigmentes fügt sich hier ebenfalls gut ein. Das Vorliegen eines Phenoxazons ist auch mit der geringen MS-Fragmentierungstendenz gut zu vereinbaren. Das Auftreten eines signifikanten Fragmentes bei $M-28\text{ME}(\text{CO})$ - wie im Spektrum des unsubstituierten Phenoxazons⁵⁰) - beobachtet man jedoch nicht. Dieser scheinbare Widerspruch wird - wie die Wasserabspaltung aus dem Molekulation - ebenfalls Gegenstand einer detaillierten Untersuchung der Massenspektren von Phenoxazonen sein.

2.4.3. Katalytische Hydrierung

Daß im roten Pigment in der Tat das Grundgerüst eines Phenoxazons vorliegt, konnte auch durch ein Hydrierungsexperiment belegt werden: Durch Aufnahme von einem Moläquivalent Wasserstoff geht das rote Pigment in eine farblose Verbindung mit dem Molgewicht 289 über (Massenspektrum), die an der Luft unter Rotfärbung Rückoxidation zur Ausgangsverbindung erleidet. Phenoxazone können auf diese Weise in 3-Hydroxyphenoxazine (8=3-Hydroxyphenoxazin) überführt werden, die jedoch instabil sind und leicht zum entsprechenden Phenoxazon oxydierbar sind⁷⁸⁾:



2.4.4. Acetylierung

Die Acetylierung des roten Pigmentes mit Acetanhydrid in Pyridin liefert ein Monoacetylderivat mit dem Molgewicht 329. Aufgrund der Elementarzusammensetzung des für die Substituenten verbleibenden Restes kann es sich dabei nur um das Derivat einer primären oder sekundären Hydroxyfunktion handeln, deren Wasserstoffatom damit auch für die beobachtete Austauschreaktion gegen Deuterium mit Deuteromethanol verantwortlich ist. Die Anwesenheit einer Hydroxyfunktion ist damit bewiesen. Paradox muß zunächst erscheinen, daß ihr Vorliegen aufgrund eines massenspektrometrischen Fragmentierungsprozesses vorhergesagt wurde, für den sie offensichtlich im vorliegenden Fall nicht verantwortlich ist.

2.4.5. ¹H-NMR-Spektren

Art und Anzahl der Substituenten des roten Pigmentes konnten aus den

^1H -NMR-Spektren der genuinen Substanz und ihres Acetylderivates abgeleitet werden, die in Abb.10 wiedergegeben sind.

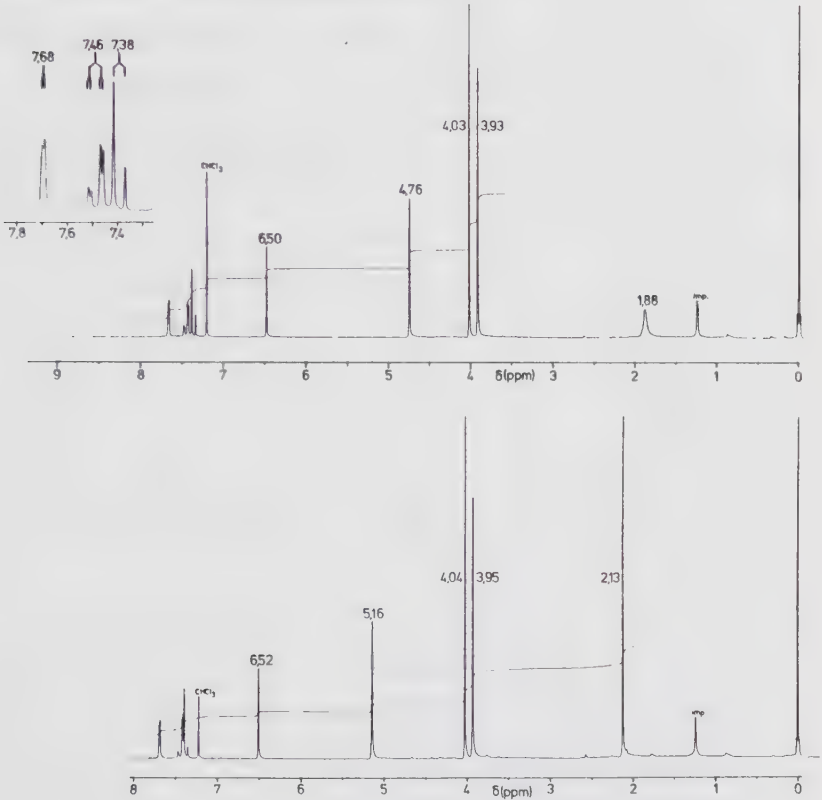


Abb.10: ^1H -NMR-Spektren (180 MHz, FT) des roten Pigmentes (oben) und seines Acetylderivates (unten) in CDCl_3

Da in DMSO als Lösungsmittel eine Auflösung der Signale im Bereich der aromatischen Protonen nicht zu erreichen war, wurden beide Spektren in Chloroform aufgenommen. Die Löslichkeit des roten Pigmentes in Chloroform erwies sich aber als nicht ausreichend zur Aufnahme eines normalen CW-Spektrums,

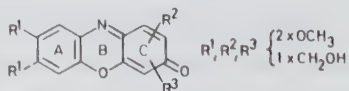
so daß auf die FT-Technik⁷⁾ zurückgegriffen werden mußte.

Im Spektrum des roten Pigmentes findet man das Singulett einer Methylen-
gruppe (2H) bei $\delta=4,76\text{ppm}$, das im Zuge der Acetylierung der Hydroxyfunk-
tion nach $\delta=5,16\text{ppm}$ verschoben wird. Damit ist die Gruppierung $-\overset{|}{\underset{|}{\text{C}}}-\text{CH}_2\text{OH}$,
also das Vorliegen einer primären Alkoholfunktion, nachgewiesen. Die Reso-
nanzen der beiden Spektren sind auf der Basis eines Phenoxazons folgender-
maßen zuzuordnen (Tab.1):

	rotes Pigment	Acetylderivat
$-\text{CH}_2\text{OH}$	1.88	---
$-\text{CH}_2\text{OCOCH}_3$	---	2.13
$-\text{OCH}_3$	3.93 u. 4.03	3.95 u. 4.04
$-\text{CH}_2\text{OH}$	4.76	---
$-\text{CH}_2\text{OCOCH}_3$	---	5.16
Ringprotonen	6.50 u. tiefer	6.52 u. tiefer

Tab.1: Zuordnung der Signale in den ^1H -NMR-Spektren des roten Pigmentes
und seines Acetylderivates (δ -Werte in ppm)

Das Phenoxazon-Grundgerüst trägt im roten Pigment also eine Hydroxymethyl-
und zwei Methoxygruppen als Substituenten, womit die Elementarzusammen-
setzung von $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{NO}_5$ exakt erreicht wird. Aus der Lage und Multiplizität
der Ringprotonen geht darüberhinaus hervor, daß drei Protonen am aroma-
tischen Ring A anzuordnen sind (tiefes Feld) und ein Proton am chinoiden
Ring C. Einer der Substituenten befindet sich daher in Position 7 oder 8
am aromatischen Ring (Multiplizitäten!), während die beiden anderen an
Ring C positioniert sein müssen (Teilstruktur 9):



Zur Festlegung der Stellung dieser Substituenten haben wir zunächst das rote Pigment in Mikroansätzen alkalisch abgebaut und die Reaktionsprodukte untersucht.

2.4.6. Alkalischer Abbau

Phenoxazone wurden bisher oxydativ und alkalisch abgebaut. Beim oxydativen Abbau erhält man unter Zerstörung des chinoiden Ringes und Erhalt des benzoiden Ringes Derivate des Benzoxazolons⁷⁹⁾.

Nach dem alkalischen Abbau von Phenoxazonen isoliert man den aromatischen Teil des Moleküls in Form eines substituierten o-Aminophenols, während der chinoide Teil als substituiertes Hydroxy-p-benzochinon anfällt⁸⁰⁾.

Unter anderem wurde das Cinnabarin (10) auf diesem Wege abgebaut (Abb.11)⁸¹⁾

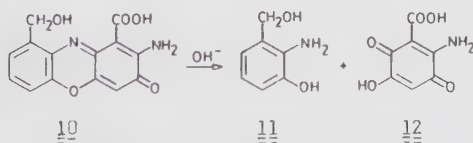
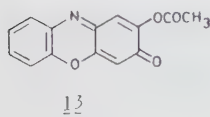


Abb.11: Alkalischer Abbau von Cinnabarin(10) nach ⁸¹⁾

Zum alkalischen Abbau setzte man bisher Substanzmengen von 60-400 mg ein. Da wir in Anbetracht der geringen zur Verfügung stehenden Menge an rotem Pigment nicht mehr als 5 mg für einen Abbauersuch einsetzen konnten, mußte zuvor mit der gleichen Menge eines synthetischen Phenoxazons überprüft werden, ob in diesem kleinen Maßstab in Anlehnung an die Literaturvorschriften die Isolierung der Umsetzungsprodukte möglich ist. Wir ver-



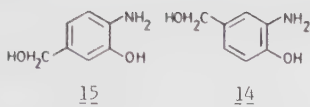
wendeten zu diesem Zweck das 2-Acetoxyphenoxazon (13), welches synthetisch leicht zugänglich ist und durch Säulenchromatographie problemlos von

begleitenden Verunreinigungen befreit werden kann (vgl.S.204).

Nach beendeter Reaktion wurden die Produkte durch präparative DC getrennt. Dabei gelang die Isolierung von o-Aminophenol (0.4 mg), das als Abbauprodukt erwartet worden war, neben geringen Mengen von 2-Aminophenoxazon, welches durch Oxydation des o-Aminophenols entstanden sein muß (vgl.S.122). Aus unbekannten Gründen konnte dagegen die als zweites Abbauprodukt erwartete Benzochinonkomponente nicht gefaßt werden. Auch der Versuch ihrer gaschromatographischen Isolierung nach vorangegangener Silylierung der Reaktionsprodukte schlug fehl.

Vom analog durchgeführten alkalischen Abbau des roten Pigmentes war demnach immerhin eine eindeutige Information über die Substitution am aromatischen Ring A des Phenoxazonringsystems zu erwarten. Wir erhielten ein substituiertes o-Aminophenol mit dem massenspektrometrisch ermittelten Molgewicht 139 (o-Aminophenol: 109). Der aromatische Molekülteil trägt also nur einen der drei Substituenten, die aus dem NMR-spektroskopischen Befund abgeleitet worden waren. Dieses Ergebnis entspricht auch der Zuordnung der Ringprotonen zu den Ringen A und C.

Acetylierung dieses Reaktionsproduktes mit einem Überschuß Acetanhydrid in Pyridin ergab ein einheitliches Tetraacetylderivat. Unter gleichen Bedingungen lieferte o-Aminophenol ein Triacetylderivat, wobei laut ^1H -NMR-Spektrum beide Protonen der Aminofunktion durch Acetylreste ersetzt worden waren. Der Substituent im aromatischen Molekülteil kann demnach nur die Hydroxymethylgruppe sein. Aufgrund der Multiplizität der Signale für die aromatischen Protonen im ^1H -NMR-Spektrum des roten Pigmentes kommen für das Abbauprodukt die beiden Strukturen 14 oder 15 infrage:



Synthetisches 14 stimmte in allen geprüften Eigenschaften (MS, MS des Tetraacetylderivates, GC-Mischinjektion) mit dem Abbauprodukt des roten Pigmentes überein. Die Synthese wurde ausgehend von 4-Hydroxy-3-nitrobenzoesäure (16) durchgeführt (Abb.12):

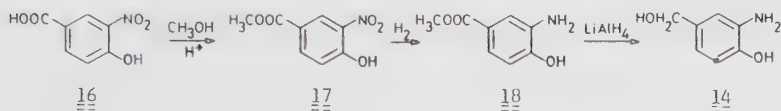
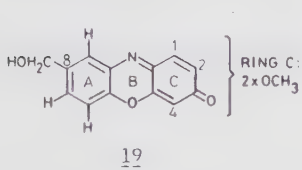


Abb.12: Synthese von 14 aus 16

Man kommt damit für das rote Pigment zur Partialstruktur 19 und kann jetzt aufgrund der Kopplungsverhältnisse eine eindeutige Zuordnung der Protonen im Ring A treffen (Tab.2):



6-H : 7.38 ppm

7-H : 7.46 ppm

9-H : 7.68 ppm

Tab.2: Zuordnung der Signale für die Protonen am Ring A im ^1H -NMR-Spektrum des roten Pigmentes (vgl. S.29)

Es verbleiben damit noch drei Strukturalternativen, die sich in der Stellung der beiden Methoxygruppen am Ring C unterscheiden: diese können 1,4-, 2,4- oder 1,2-ständig sein. Eine Klärung dieser Frage ist durch Synthese der Isomeren möglich, die jedoch zunächst ausgearbeitet werden mußte, da alle drei Verbindungen bisher in der Literatur nicht beschrieben sind. Ein anderer - schnellerer - Weg der Strukturermittlung beruht auf einem Vergleich der NMR-Spektren von Vergleichsverbindungen mit demjenigen des roten Pigmentes.

2.4.7. ^1H -NMR-Spektren von Vergleichsverbindungen - Ermittlung der Struktur des roten Pigmentes

Die Frage, die zu benatworten war, lautete: Ist das Signal bei 6.50 ppm im Spektrum des roten Pigmentes (bzw. 6.52 ppm im Spektrum des Acetylderivates) aufgrund seiner chemischen Verschiebung dem Proton an C-1, C-2 oder C-4 zuzuordnen. Um dies zu klären, mußte zunächst das Spektrum von unsubstituiertem Phenoxazon (7) aufgenommen werden, um die Verschiebungswerte dieser drei Protonen zu bestimmen. Anschließend war zu untersuchen, welchen quantitativen Effekt die Einführung einer Methoxygruppe in den Ring C auf die Lage dieser Protonen ausübt. Da 2-Methoxyphenoxazone präparativ leicht zugänglich sind⁸²⁾, wurde Verbindung 20 als zweites Phenoxazon (vgl.S.206) neben dem ebenfalls leicht synthetisierbaren Grundkörper 7⁸²⁾ dargestellt und NMR-spektroskopisch vermessen. Die Acetoxymethylgruppe an C-8 schafft optimale Vergleichsmöglichkeiten mit dem Spektrum des roten Pigmentes nach Acetylierung (Teilstruktur 21):

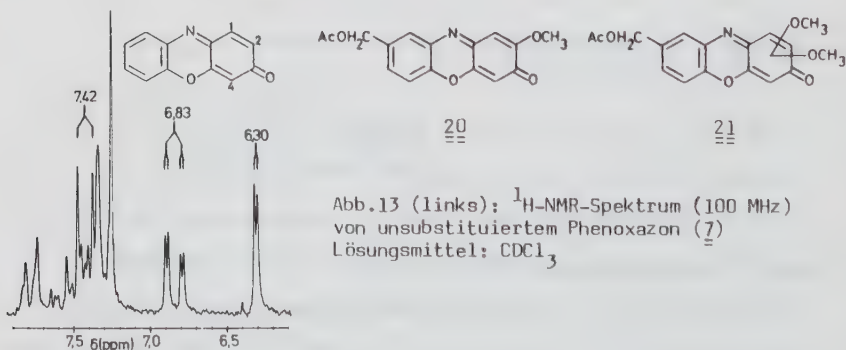


Abb.13 (links): ^1H -NMR-Spektrum (100 MHz) von unsubstituiertem Phenoxazon (7)
Lösungsmittel: CDCl_3

Anhand der Multiplizitäten im Spektrum von 7 (Abb.13) lassen sich die Signale eindeutig zuordnen: Das 4-H erscheint bei 6.30 ppm (long-range-Kopplung

mit dem 2-H), das 2-H bei 6.83 ppm (Kopplung mit dem 1-H und dem 4-H) und das 1-H bei 7.42 ppm (durch "spin-tickling" am 2-H ermittelt). Man beachte die sehr tiefe Lage dieses Protons!

Abb.14 zeigt das Spektrum des 2-Methoxyphenoxazons 20. Bei tiefem Feld findet man hier nur die Signale der drei aromatischen Protonen (Multiplizitäten!), während die Absorptionen bei 6,38 und 6.60 ppm dem 4-H bzw. 1-H zugeordnet werden müssen. Die Zuordnung gründet sich auf folgende Argumentation: Entspreche die Signallage von 6.60 ppm der Absorption des 4-H, so hätte gegenüber dem Spektrum von 7 eine Verschiebung um ca. 0.3 ppm zu tiefem Feld stattgefunden. Die Einführung einer Methoxygruppe in den Ring C

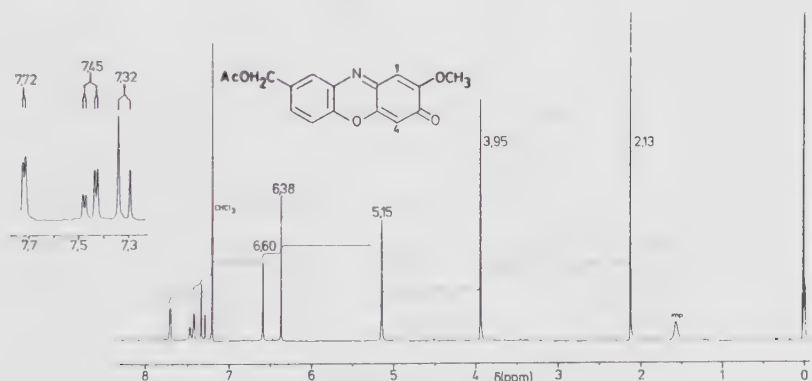
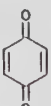
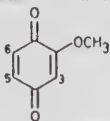
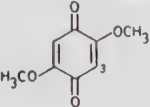
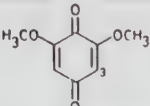
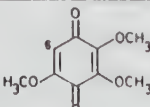


Abb.14: ^1H -NMR-Spektrum (180 MHz, FT) von 20

muß sich jedoch - falls überhaupt ein Effekt beobachtet wird - in einer Hochfeldverschiebung der Signale für das 1-H und 4-H äußern. Andererseits ist der zu erwartende Einfluß der zusätzlichen Acetoxymethylgruppe am Ring A auf die Signallage für die Protonen am Ring C gering. Wir gehen daher davon aus, daß das Signal bei 6,60 ppm dem 1-H zugeordnet werden muß (das entspricht einer Hochfeldverschiebung durch die Methoxygruppe um

ca. 0,8 ppm gegenüber dem Spektrum von 7) und daß das Signal für das 4-H ohne nennenswerte Veränderung seiner Lage bei 6,38 ppm erscheint.

Zur Abstützung dieser Argumentation haben wir die ^1H -NMR-Spektren einiger Methoxybenzochinone zu Vergleichszwecken aufgenommen, deren NMR-Daten in der Literatur nicht zur Verfügung standen. Tab.3 faßt unsere Ergebnisse zusammen. (Auf die Synthese dieser Benzochinone wird später noch eingegangen.) Es läßt sich demnach bestätigen, daß das Signal eines Protons am

	2-H	3-H	5-H	6-H	OCH ₃
 $\underline{\underline{22}}$					6,83(4H)
 $\underline{\underline{23}}$		6,1	5,76(2H)		3,77
 $\underline{\underline{24}}$		5,97		5,97	3,77
 $\underline{\underline{25}}$		5,97(2H)			3,77
 $\underline{\underline{26}}$			5,92		3,77 3,83 3,95

Tab.3: ^1H -NMR-Signale (δ -Werte in ppm) der Methoxybenzochinone $\underline{\underline{22-26}}$ (in $[\text{D}_6]$ DMSO)

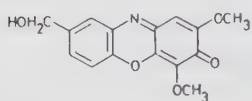
Chinonring durch eine α -ständige Methoxygruppe um ca. 0,7 ppm und durch eine β - bzw. γ -ständige Methoxygruppe um maximal 0,1 ppm zu hohem Feld verschoben wird.

Mit diesen Befunden sind die drei möglichen Strukturalternativen für das rote Pigment wie folgt zu beurteilen:

1. Nimmt man eine 1,4-Anordnung der beiden Methoxygruppen im chinoiden Ring C an, so hat man das 2-H bei etwa 6.0 ppm zu erwarten (Verschiebung um ca. 0.8 ppm zu hohem Feld gegenüber der Signallage von 6.83 ppm im unsubstituierten Phenoxazon (7)). Aufgrund der Signallage von 6.52 ppm im Spektrum des roten Pigmentes nach Acetylierung scheidet diese Möglichkeit aus.

2. Als Alternativen verbleiben damit eine 1,2- oder eine 2,4-Anordnung der beiden Methoxygruppen. Bei einer 1,2-Anordnung erwartet man die Signallage für das 4-H bei ca. 6.30 ppm (Verschiebung um knapp 0.1 ppm zu höherem Feld gegenüber dem Spektrum des 2-Methoxyphenoxazons 20). Bei einer 2,4-Anordnung errechnet sich die Lage des Signals für das 1-H bei ca. 6.50 ppm (wie oben: Verschiebung des 1-H zu höherem Feld). Die im Spektrum des roten Pigmentes nach Acetylierung anzutreffende Signallage von 6.52 ppm belegt daher das Vorliegen eines 2,4-Dimethoxyphenoxazons.

Die Struktur des roten Pigmentes ist damit identisch mit derjenigen des 2,4-Dimethoxy-8-(hydroxymethyl)phenoxazons (27). Wir haben dieser bisher weder als Naturstoff noch als synthetischer Substanz bekannten Verbindung aufgrund ihres Vorkommens als Stoffwechselprodukt von S.michiganensis den Namen "Michigazon" gegeben. Ein unabhängiger Beweis der Struktur konnte



27

später durch Synthese von Michigazon erbracht werden (vgl. S. 126). Das synthetische Material stimmt in allen geprüften Eigenschaften mit dem genuine Material überein.

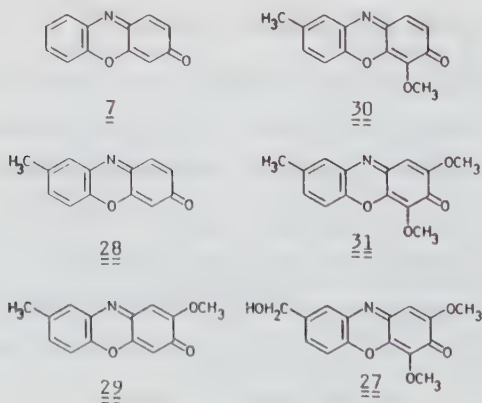
2.5. Massenspektrometrische Untersuchungen an Phenoxazonen

Sämtliche im folgenden Abschnitt der Arbeit aufgeführten und für die massenspektrometrischen Untersuchungen notwendigen Phenoxazone mußten zunächst synthetisiert werden. Die Beschreibung dieser Synthesen ist Gegenstand eines späteren Kapitels.

2.5.1. Erarbeitung eines Fragmentierungsschemas für den MS-Zerfall von Michigazon

Nachdem die Struktur von Michigazon(27) eindeutig abgeleitet worden war, stellten wir uns die Frage, wie die massenspektrometrische Fragmentierung mit dieser Struktur korrelierbar ist. Dabei richtete sich unser Interesse insbesondere auf den Fragmentierungsschritt, im Zuge dessen H_2O aus dem Molekülion abgespalten wird, denn es hatte sich gezeigt, daß die einzige Hydroxygruppe im Molekül (Hydroxymethylfunktion an C-8) an diesem Prozeß nicht beteiligt ist (vgl.S.26).

Zur Erarbeitung eines Fragmentierungsschemas für den MS-Zerfall von Michigazon ist es zweckmäßig, von Phenoxazonen auszugehen, die nur Teilstrukturen von 27 repräsentieren und zunächst deren Massenspektren zu disku-



tieren. Der Interpretation des Spektrums von unsubstituiertem Phenoxazon (7) soll daher die Diskussion der Spektren von 8-Methylphenoxazon(28), 2-Methoxy-8-methylphenoxazon(29) und 4-Methoxy-8-methylphenoxazon(30) folgen. Mit den dabei gewonnenen Erkenntnissen soll an die Interpretation der Massenspektren von 2,4-Dimethoxy-8-methylphenoxazon(31) und Michigazon (27) herangegangen werden. Charakteristische Unterschiede beim Übergang von einem Substitutionsmuster zum anderen sollen dabei im Vordergrund stehen.

2.5.1.1. Das Massenspektrum von unsubstituiertem Phenoxazon(7)

Die Massenspektren von 7 sowie einiger Benzophenoxazone wurden 1977 veröffentlicht⁵⁰⁾. Abb.15 entstammt dieser Originalarbeit (S.40). Die Autoren formulieren das in Abb.16 wiedergegebene Fragmentierungsschema und stützen

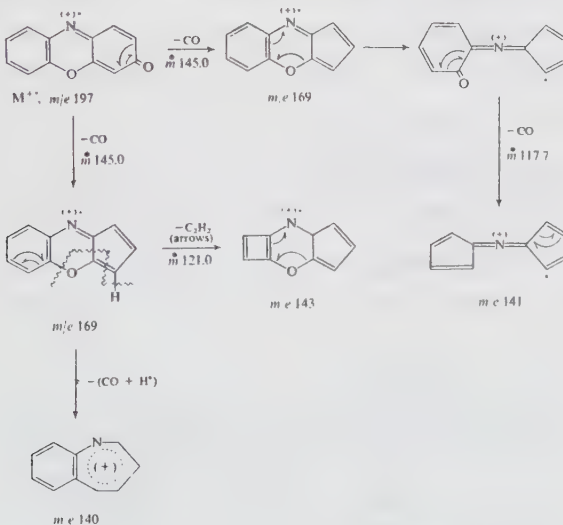


Abb.16: Fragmentierungsschema für den MS-Zerfall von 7 nach⁵⁰⁾ (Ausschnitt)

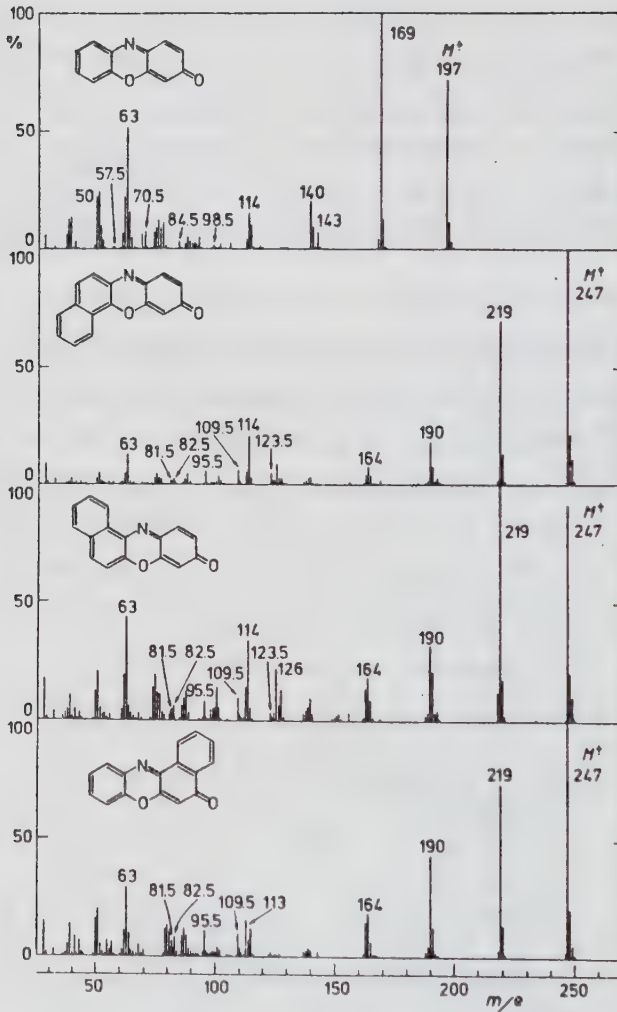


Abb.15: Massenspektren von 7 sowie isomerer Benzo-phenoxazone nach ⁵⁰⁾

ihren Vorschlag auf die Beobachtung metastabiler Signale sowie auf DADI-Spektren und hochaufgelöste Messungen. Isotopenmarkierte Verbindungen wurden nicht untersucht.

Hauptfragmentierungsprozeß ist die Abspaltung von $28\text{ME}(\text{CO})$ aus dem Molek $\ddot{u}$ lion unter Bildung des Fragmentes $\underline{a}(\text{m/e } 169)$. Dieser Fragmentierungsschritt entspricht der Erwartung, denn die von den Autoren formulierte Ringverengungsreaktion unter Eliminierung des Chinoncarbonyls in Form von Kohlenmonoxid wird an chinoiden Systemen sehr häufig beobachtet⁸³⁾.

Für das Zustandekommen der Ionen bei $\text{m/e } 141$ und $\text{m/e } 140$ werden zwei verschiedene Reaktionswege ausgehend von $\underline{a}$ als Mutterion formuliert. Demnach soll das Kohlenstoffatom, das bei der Genese der beiden Fragmente abgespalten wird, im einen Falle aus Ring A ($\text{m/e } 141$), im anderen Falle aber aus Ring C ($\text{m/e } 140$) stammen. Insbesondere die Formulierung des Ions $\text{m/e } 140$ gab uns Anlaß, diesen Sachverhalt zu überdenken, da zum Erreichen der registrierten Masse das Vorliegen einer Dreifachbindung im Heterocycl $\ddot{u}$ s gefordert werden muß, die jedoch in dem Formelbild nicht zum Ausdruck kommt. Die angegebene Ionenstruktur erscheint uns daher als wenig wahrscheinlich. Während die Bildung des relativ schwächeren Ions $\text{m/e } 141$ aus $\underline{a}$ durch ein metastabiles Signal gesichert ist, ist dies für die Genese von $\text{m/e } 140$ nicht der Fall; ^{13}C -Isotopenmarkierungsexperimente liegen nicht vor.

Aus den angegebenen Gründen schlagen wir den in Abb.17 wiedergegebenen alternativen Weg vor, auf dem $\text{m/e } 140$ durch Abspaltung eines Wasserstoffradikals aus $\text{m/e } 141$ hervorgeht. Für beide Fragmente ergeben sich neue Strukturvorschläge, im Falle von $\text{m/e } 141$ unter Annahme eines H-Transfers auf das Stickstoffatom. Wasserstoffwanderungen treten im Zuge massen-

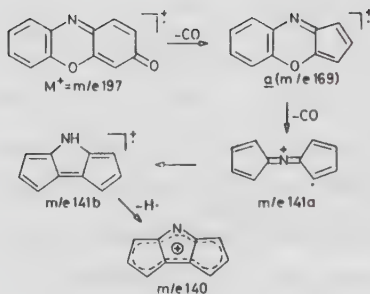


Abb.17: Vorschlag für die Bildung der Fragmente m/e 141 und m/e 140 beim MS-Zerfall von 7



Abb.18: Strukturvorschläge für das Ion $C_{11}H_7^+$ (m/e 139) im MS von 1- bzw. 2-Methylantrachinon nach⁸⁵⁾

spektrometrischer Fragmentierungsprozesse häufig auf⁸⁴⁾. Ähnliche Strukturvorschläge wie für das Fragment m/e 140 aus 7 sind in der Literatur für das Ion $C_{11}H_7^+$ (m/e 139) in den Spektren von 1- und 2-Methylantrachinon gemacht worden (Abb.18)⁸⁵⁾.

2.5.1.2. Das Massenspektrum von 8-Methylphenoxazon(28)

Abb.19 zeigt die Massenspektren von 7 und 28. Durch die Methylgruppe an C-8 von 28 wird das Fragmentierungsverhalten gegenüber 7 nicht verändert: Die Fragmente zeigen den erwarteten Shift von 14ME zu höheren Massen (m/e 169 nach m/e 183(a), m/e 140 nach m/e 154).

2.5.1.3. Das Massenspektrum von 2-Methoxy-8-methylphenoxazon(29)

Das Massenspektrum von 29 ist in Abb.20 wiedergegeben. In der Hauptfragmentierungsreaktion verliert das Molekülion 29ME(CHO) unter Bildung des Fragmentes m/e 212 (base peak, metastabiles Signal bei m/e 186,5), während

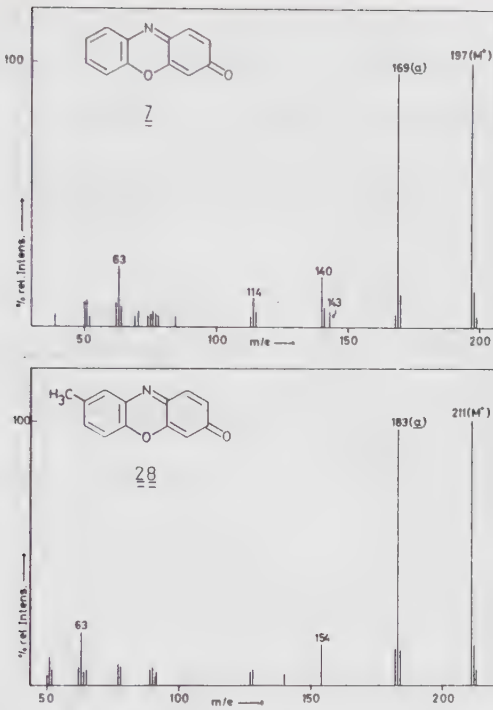


Abb. 19: Massenspektren von 7 und 28

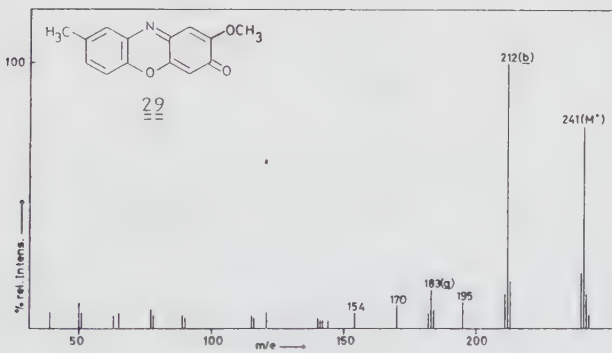


Abb.20: Massenspektrum von 29

aus dem Molekülion von 28 28ME(CO) eliminiert werden. Vergleicht man die relativen Signalintensitäten beider Spektren, so findet man hinsichtlich dieser Fragmentierungsprozesse eine gute Übereinstimmung. Es liegt daher nahe, für 29 einen ähnlichen Fragmentierungsmechanismus vorzuschlagen unter Eliminierung eines zusätzlichen Wasserstoffradikals aus der gegenüber 28 neu hinzugekommenen Methoxygruppe an C-2.

Die Beteiligung eines Wasserstoffatoms der Methoxygruppe wird durch das Spektrum der deuteriummarkierten Verbindung 29d (Abb.21) bestätigt:

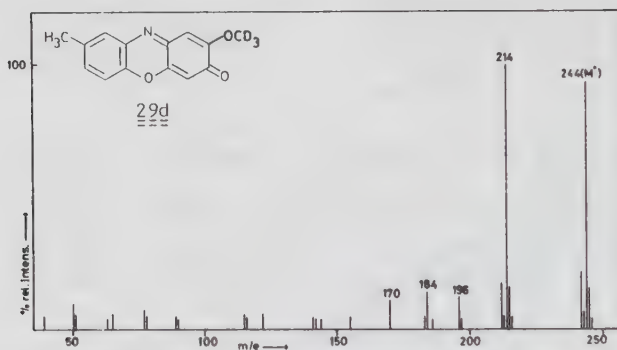


Abb.21: Massenspektrum von 29d

Entsprechend der Abspaltung von COO vergrößert sich die Differenz zwischen Molekülion und Fragment auf 30ME.

Die Abspaltung eines Wasserstoffradikals aus der Methoxyfunktion von 29 ist auch für die Genese des Fragmentions bei M-IME (das Spektrum von 28 enthält dieses Fragment nicht!) verantwortlich: Im Spektrum der deuteriummarkierten Verbindung 29d erscheint dieses Ion überwiegend bei M-2ME (Abspaltung eines Deuteriumradikals). Abb.22 enthält Strukturvorschläge für die Fragmente M-CHO und M-H.

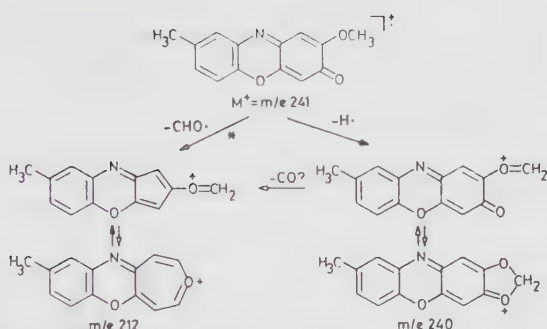


Abb.22: Strukturvorschläge für die Ionen $m/e\ 212$ und $m/e\ 240$ im MS von 29

Die Formulierung von Oxoniumionen, deren Strukturen mit unseren Vorschlägen in Abb.22 vergleichbar sind, wird in der Literatur häufig gewählt. Dies gilt u.a. für das Fragment M-1ME im Spektrum von 1-Methoxyphenazin(32)⁶⁴⁾ sowie für das Ion bei M-15ME(CH₃) im Spektrum von 2,3-Dihydrobenzoxepin(33)⁸⁶⁾ (Abb.23).

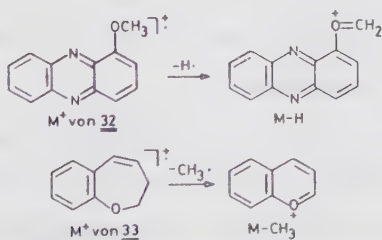


Abb.23: Strukturen der Fragmente M-H im MS von 32 nach ⁶⁴⁾ und M-CH₃ im MS von 33 nach ⁸⁶⁾

Um das an der Eliminierung von CHO aus dem Molekülion unter Bildung des base peaks beteiligte Sauerstoffatom eindeutig identifizieren zu können, haben wir das Spektrum der ¹⁸O-markierten Verbindung 29a aufgenommen (Abb.24):

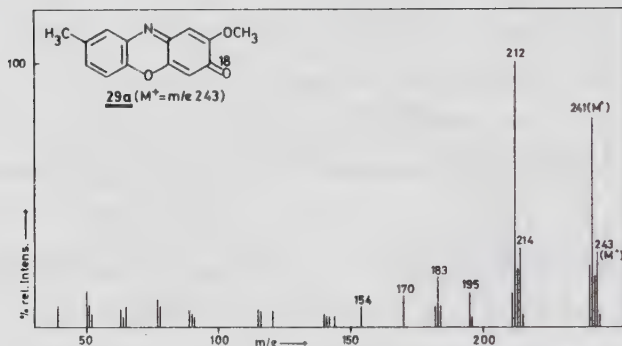


Abb.24: Massenspektrum von 2-Methoxy-8-methyl-
- [Carbonyl-¹⁸O]phenoxazon (29a, $M^+ = m/e$ 243, 26%)
neben unmarkiertem 29 ($M^+ = m/e$ 241, 74%)

Die Auswertung dieses Spektrums ergibt jedoch den überraschenden Befund, daß der angenommene Fragmentierungsmechanismus für die Bildung des Fragmentes M-CHO nicht zutreffend sein kann: Das Fragment enthält noch die gesamte ¹⁸O-Markierung des Molekülions (m/e 214!). Das Sauerstoffatom der Carbonylfunktion ist also entgegen der Erwartung am betrachteten Fragmentierungsprozeß nicht beteiligt.

Die eindeutige Antwort auf die Frage nach der Herkunft des beteiligten Sauerstoffatoms liefert das Spektrum der di-¹⁸O-markierten Verbindung 29b (Abb.25): Da das Fragmentation nur noch einfach markiert ist und eine Beteiligung des Carbonylsauerstoffatoms bereits ausgeschlossen werden konnte, muß es das Sauerstoffatom der Methoxyfunktion sein, welches spezifischer Bestandteil der abgespaltenen Elementkombination ist.

Auch das am Fragmentierungsprozeß beteiligte Kohlenstoffatom stammt aus dieser Methoxygruppe, wie anhand des Spektrums der ¹³C-markierten Verbindung 29c (Abb.25) belegt werden kann: Man beobachtet - entsprechend

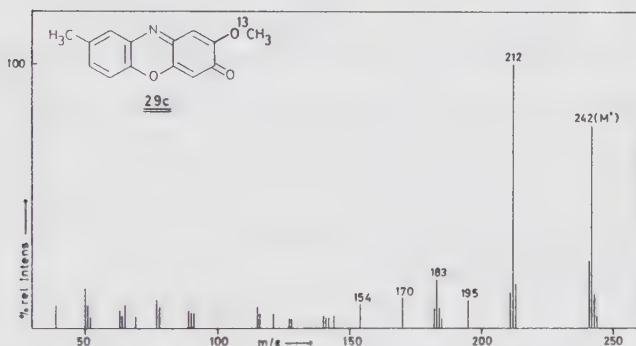
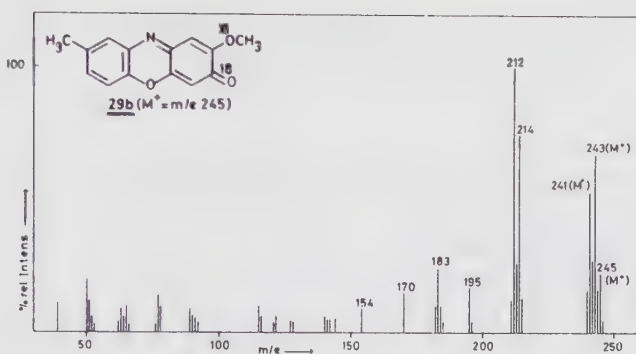


Abb. 25

a) MS von 2- $[^{18}O]$ Methoxy-8-methyl- $[^{18}O]$ phenoxazon (29b, $M^+ = m/e$ 245, 16%) neben geringer markierten Spezies (mono- ^{18}O : m/e 243, 47% ; unmarkiert: m/e 241, 37%)

b) MS von 2- $[^{13}C]$ Methoxy-8-methylphenoxazon (29c)

der Abspaltung von ^{13}CHO - eine Massendifferenz von 30ME zwischen Molekölion und Fragment. Die Hauptfragmentierungsprozesse aus den Molekölionen von 28 und 29 sind demnach bezüglich der an ihnen beteiligten Atome und Fragmentierungsmechanismen nicht miteinander verwandt (Abb. 26).

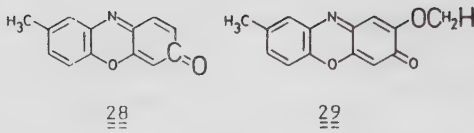


Abb.26: CO-Abspaltung aus dem Molekülion von 28
bzw. CHO-Abspaltung aus dem Molekülion von 29:
Kennzeichnung der Atome, aus denen das jeweils eliminierte Teilchen zusammengesetzt ist.

Typisch für die Fragmentierung an Methoxygruppen ist im allgemeinen die Eliminierung von 15ME(CH₃), 30ME(CH₂O), 31ME(OCH₃) oder auch 43ME(CH₃+CO)⁸⁷⁻⁹⁰⁾. Der ausgeprägte Verlust eines CHO-Radikals wird dagegen nur in Ausnahmefällen beobachtet, wie z.B. im Spektrum des 3,5-Dimethoxytoluols(34)⁹¹⁾. Die Autoren formulieren diesen Prozeß unter zweifacher Wasserstoffübertragung aus einer der beiden Methoxygruppen auf den Ring und Ausbildung eines Oxoniumions mit chinoider Struktur (Abb.27):

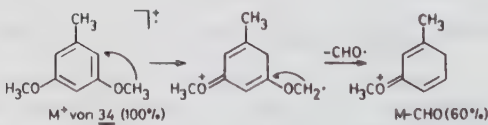


Abb.27: Bildung des Fragmentes M-CHO aus dem Molekülion von 34 nach⁹¹⁾

Für 2-Methoxyphenazin(35) ist ein ähnlicher Fragmentierungsprozeß beschrieben, doch erreicht das entsprechende Fragment nur eine relative Intensität von 6% (Mutterion=M⁺=100%, Abb.28)⁶⁴⁾.

Den auffallend ausgeprägten Verlust von CHO aus der Methoxygruppe des 2-Methoxy-8-methylphenoxazons(29) erklären wir unter Einbeziehung der

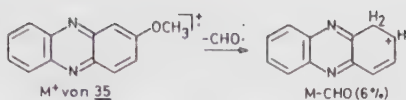


Abb. 28: Strukturvorschlag für das Fragment
M-CHO im MS von 35 nach ⁶⁴⁾

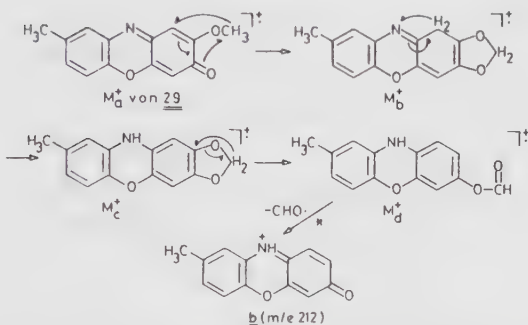


Abb. 29: Bildung des Fragmentes M-CHO im MS von 29:
Vorschlag für den Fragmentierungsmechanismus und
für die Struktur des Fragmentions (b, m/e 212)

benachbarten Carbonylgruppe in den Fragmentierungsmechanismus folgendermaßen (Abb. 29): Verbunden mit einem zweimaligen H-Transfer aus der Methoxygruppe auf das Ringsystem erfolgt eine Umlagerung des Moleküls zur Struktur M_d^+ , aus der die Abspaltung eines CHO-Radikals unter Bildung des Ammoniums der Struktur b plausibel ist. Eine mit Struktur b vergleichbare Formulierung wurde für das Fragment M-CH₃ im Spektrum von 2-Chlor-3-methoxyphenothiazin(36) vorgeschlagen (Abb. 30)⁵⁶⁾.

Das Fragment m/e 211 im Spektrum von 29 kann formal entweder durch Verlust eines Wasserstoffradikals aus dem base peak (Fragment b) oder eines

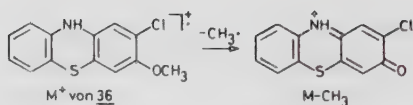


Abb. 30: Strukturvorschlag für das Fragment $M-CH_3$ im MS von 36 nach⁵⁶⁾

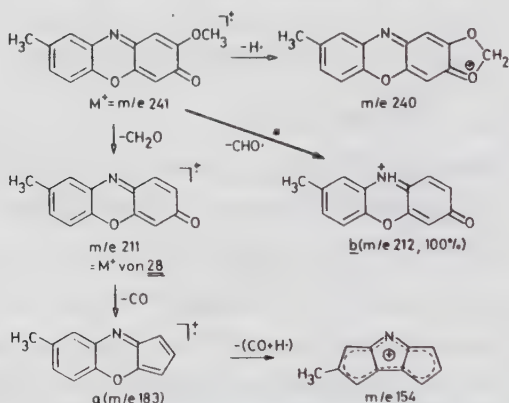


Abb. 31: Fragmentierungsschema für den MS-Zerfall von 29

Moleküls Formaldehyd direkt aus dem Molekülion entstehen. Eine Eliminierung von CH_2O (=30ME) aus einer Methylethergruppe ist nicht ungewöhnlich und wird auch als Fragmentierungsprozeß bei Methoxyphenazinen gefunden⁶⁴⁾. Das Spektrum des deuteriummarkierten Phenoxazons 29d (S.44) bestätigt, daß beide Wasserstoffatome der eliminierten Elementkombination aus der Methoxyfunktion stammen: Die Massendifferenz zwischen Molekülion ($m/e\ 244$) und Fragment ($m/e\ 212$) beträgt hier 32ME(CD_2O). Wir ordnen daher dem Fragment $m/e\ 211$ im Spektrum von 29 die gleiche Struktur wie dem Molekülion von 8-Methylphenoxazon(28) zu.

Zusammenfassend läßt sich damit als Ergebnis der MS-Untersuchungen an spezifisch isotonenmarkierten Verbindungen für 29 das in Abb.31 wiedergegebene Fragmentierungsschema aufstellen.

2.5.1.4. Fazit von Kap. 2.5.1.2. und 2.5.1.3.

1. Sämtliche Primärfragmentierungsschritte im MS von 29 verlaufen unter Verlust von Atomen, die aus der Methoxygruppe an C-2 stammen.
2. Der Verlust eines CHO-Radikals aus der Methoxyfunktion ist in so ausgeprägter Form (unter Bildung des base peaks) als MS-Fragmentierungsreaktion ungewöhnlich.
3. Die Eliminierung der Carbonylgruppe in Form von CO(28ME) aus dem Molekülion - Hauptfragmentierungsreaktion im Spektrum von 8-Methylphenoxazon(28) - wird im Spektrum von 29 nicht beobachtet.

2.5.1.5. Das Massenspektrum von 4-Methoxy-8-methylphenoxazon(30)

Abb.32 zeigt die Spektren von 30 und der ¹⁸O-markierten Verbindung 30a. Vergleicht man das Spektrum von 30 mit demjenigen von 29 (S.43); so sind drei Beobachtungen festzuhalten:

1. Das Fragment b(m/e 212) tritt mit wesentlich geringerer Intensität auf.
2. Die Fragmente m/e 223, 198 und 167 kommen neu hinzu, wobei m/e 198 zweitstärkstes Signal nach dem Molekülion ist.
3. Die übrigen Fragmente sind sowohl im MS von 30 als auch im Spektrum von 29 mit vergleichbaren Intensitäten vorhanden.

Wie die ¹⁸O-Markierung der Carbonylgruppe zeigt (Spektrum von 30a), ist die Genese von m/e 212 im MS von 30 - im Gegensatz zu 29 - nicht einheitlich: Während das Molekülion einen 49%-igen ¹⁸O-Gehalt aufweist (m/e 243), ist das Fragment nur noch zu 36% markiert (m/e 214). Im Gegensatz zu 29

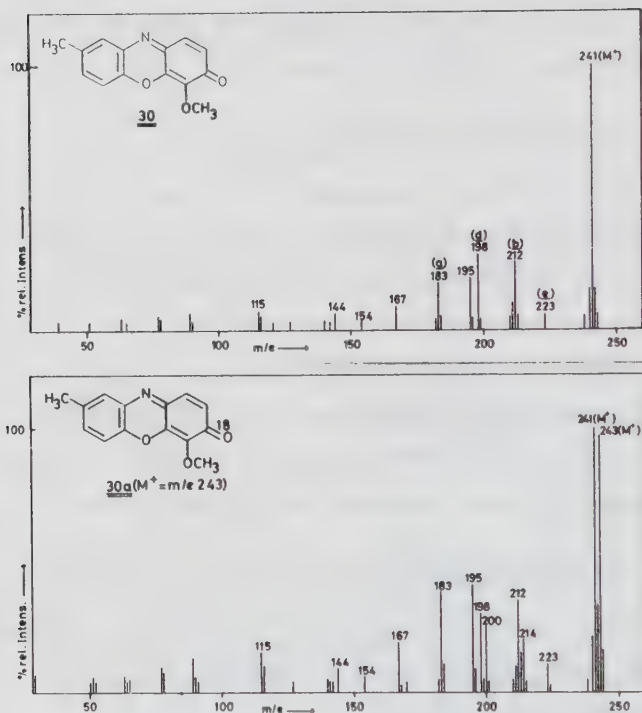


Abb.32: Massenspektren von 4-Methoxy-8-methylphenoxazon(30) und von 4-Methoxy-8-methyl-¹⁸O-phenoxazon(30a, M⁺=m/e 243, 49%) neben unmarkiertem 30 (M⁺=m/e 241, 51%)

nimmt hier offenbar auch der Carbonylsauerstoff in einem zweiten Fragmentierungsmechanismus an der Reaktion teil, wie er anfangs für 29 vorgeschlagen wurde (S. 44), dann jedoch verworfen werden mußte.

Den Hauptfragmentierungsprozeß sehen wir allerdings in Analogie zu 29: In beiden Verbindungen ist die Methoxygruppe (in 29 an C-2, in 30 an C-4) zur Carbonylfunktion benachbart. Die Formulierung der Umlagerung des Moleküls von 29 (S.49) ist daher auf das Molekölion von 30 übertragbar.

Das Fragment m/e 198 kann nur direkt aus dem Molekülion entstehen: Wie das Spektrum von 30a zeigt, ist der Carbonylsauerstoff an diesem Fragmentierungsschritt nicht beteiligt. Plausibel erscheint uns ein* Zweistufenmechanismus unter Eliminierung der Methoxygruppe (wobei das Ion c - siehe Abb.33 - wegen sehr geringer Stabilität im Spektrum nicht auftritt):

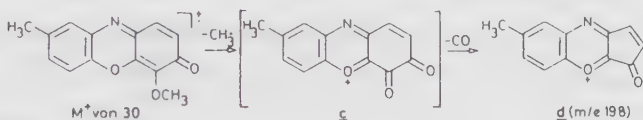


Abb.33: Bildung von m/e 198 aus dem Molekülion von 30:
Vorschlag für den Geneseweg und für die Struktur (d)

Dieser Fragmentierungsprozeß ist offenbar typisch für eine Methoxygruppe in Position 4 des Phenoxazongerüstes, während der Verlust eines CHO-Radikals deutlich weniger ausgeprägt ist als bei der 2-Methoxyverbindung 29.

Wir messen dem zur Methoxygruppe an C-4 benachbarten Ringsauerstoffatom für den Ablauf dieses Prozesses entscheidende Bedeutung zu, da es die positive Ladung übernehmen kann und die Ausbildung des stabilen Oxoniumions d ermöglicht. Ein vergleichbarer Zerfall wurde ausgehend vom Molekülion des 1-Methoxyphenothiazins(37) beobachtet (Abb.34)⁵⁶⁾.

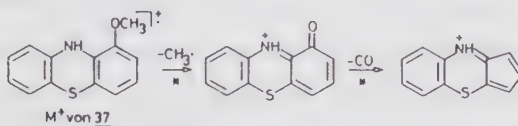


Abb.34: MS-Zerfall unter Eliminierung der Methoxygruppe von 37 nach⁵⁶⁾

Das Fragment m/e 223 ist Schlüsselfragment zum Verständnis der Genese von m/e 195, denn durch metastabile Signale ist folgende Sequenz eindeutig belegt:



Wir gehen davon aus, daß die Bildung des Ions m/e 195 im Spektrum von 2-Methoxy-8-methylphenoxazon(29) nach dem gleichen Mechanismus abläuft wie im Spektrum von 30, wobei das Fragment m/e 223 wegen zu geringer Stabilität jedoch nicht auftritt. Neben dem Spektrum der ¹⁸O-markierten Verbindung 30a konnten wir daher auch die Spektren der spezifisch isotopenmarkierten Verbindungen 29b, 29c und 29d (S.44 u. 47) heranziehen, um die Herkunft der Atome abzuleiten, aus denen sich die in den einzelnen Fragmentierungsschritten der o.a. Sequenz eliminierten Moleküle (H₂O und CO) zusammensetzen:

An der Wasserabspaltung aus dem Molekülion von 30 unter Bildung des Fragmentes m/e 223(e, siehe Abb.35) ist das Sauerstoffatom der Carbonylgruppe beteiligt, wie aus dem Spektrum von 30a eindeutig hervorgeht (kein Fragment bei m/e 225). Wassereliminierungen unter Beteiligung von Keto-Sauerstoffatomen sind - wenn auch selten mit ausgeprägter Intensität - als massenspektrometrische Fragmentierungsprozesse literaturbekannt⁹²⁻⁹⁴).

Aufgrund der Verschiebung des Fragmentes m/e 195 (im Spektrum von 29) nach m/e 196 im Spektrum der deuteriummarkierten Verbindung 29d (Abspaltung von D₂O+CO aus dem Molekülion) läßt sich die Beteiligung von zwei Wasserstoffatomen der Methoxygruppe an der Wassereliminierung aus dem Molekülion von 30 unter Bildung des Fragmentes m/e 223 indirekt beweisen. Mit diesen Befunden diskutieren wir die Abspaltung des Wassermoleküls aus der umgelagerten Form M_D⁺(Abb.35) des Molekülions von 30.

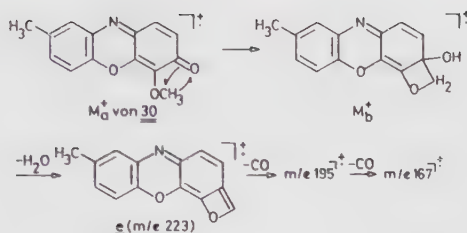


Abb.35: Bildung des Fragmentes m/e 223 aus dem Molek lion von 30: Vorschlag für den Mechanismus und die Struktur (e)

Darüberhinaus steht fest, daß die CO-Eliminierung von e nach m/e 195 unter Beteiligung des Kohlenstoff- und Sauerstoffatoms der ehemaligen Methoxygruppe verläuft: Dies ergibt sich aus der gegenüber 29 unveränderten Lage von m/e 195 in den Spektren der ^{18}O - und ^{13}C -markierten Verbindungen 29b und 29c (Abspaltung von H_2 $^{18}O + C^{18}O$ bzw. $H_2O + ^{13}CO$ aus dem Molek lion). Wir kommen damit für Verbindung 30 zu dem in Abb.36 wiedergegebenen Fragmentierungsschema:

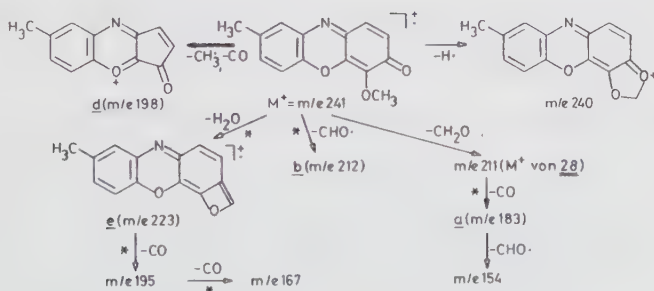


Abb.36: Fragmentierungsschema für den MS-Zerfall von 30

2.5.1.6. Fazit von Kap. 2.5.1.5.

1. Die Fragmentierungstendenz des Molekülions der 4-Methoxy-Verbindung 30 ist deutlich geringer als beim 2-Methoxy-Isomeren 29.
2. Das Fragmentierungsverhalten wird auch im Falle der Verbindung 30 weitgehend von der Methoxygruppe geprägt.
3. Die Bildung des Fragmentes b ($M-CHO$) verliert an Bedeutung zugunsten der Bildung des charakteristischen Fragmentes d ($M-(CH_3+CO)$). Beide Prozesse verlaufen unter Eliminierung der Methoxyfunktion.

2.5.1.7. Die Massenspektren der 2,4-Dimethoxyphenoxazone

Abb.37 zeigt die Massenspektren der 2,4-Dimethoxyphenoxazone 31, 38 und 39 (=Acetylderivat von Michigazon). Augenfällig ist die Übereinstimmung des Fragmentierungsverhaltens aller drei Verbindungen (einschließlich der relativen Intensitäten einander entsprechender Fragmente) mit dem MS-Zerfall von Michigazon(27, vgl.S.25). Auffallend ist insbesondere die Bildung eines intensiven Fragmentes bei $M-18ME$; dieses Ion geht in metastabilem Übergang direkt aus dem Molekülion hervor und kommt durch Abspaltung von Wasser zustande, wie die hochaufgelöste Messung beweist. Das Fragment ist nach dem Molekülion der zweitstärkste Peak in allen vier Spektren.

Naheliegender war zunächst die Annahme, die OH-Gruppe des Substituenten an C-8 von 27 sei an dieser Wasserabspaltung beteiligt. Im Spektrum von 39 wäre dann eine der Wasserabspaltung aus 27 entsprechende Abspaltung von Essigsäure zu erwarten, während in den Spektren von 31 und 38 eine Wasserabspaltung nicht auftreten dürfte. (vgl. auch das Ergebnis des H/D-Austausches bei 27, S.26.) Die Massenspektren in Abb.37 beweisen daher eindeutig, daß die anfangs gemachte Annahme offenbar falsch war: Der Wasserverlust aus

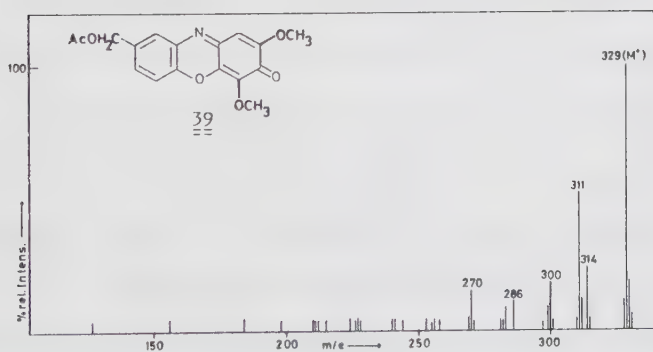
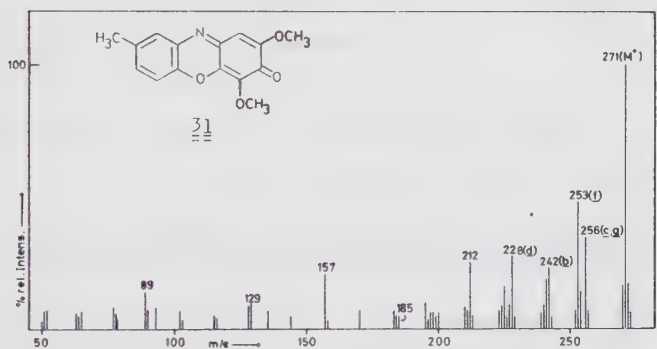
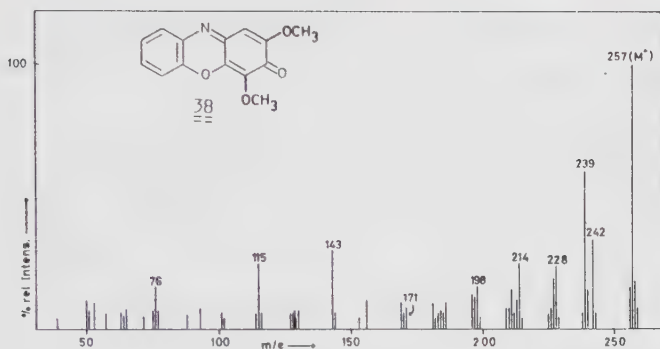


Abb. 37: Massenspektren von 2,4-Dimethoxyphenoxazon(38),
2,4-Dimethoxy-8-methylphenoxazon(31) und
8-Acetoxymethyl-2,4-dimethoxyphenoxazon(39)

dem Molekülion ist unabhängig von der Art des Substituenten an C-8 des Phenoxazonringsystems.

Stellvertretend für alle vier o.g. Verbindungen soll das Spektrum von 31 (bzw. 38 im Falle zweier selektiv isotoopenmarkierter Verbindungen) interpretiert werden. Vergleicht man das Spektrum von 31 mit denen von 29 (S.43) und 30 (S.52), also mit den Spektren von Verbindungen, die bereits einen Teil der Substituenten von 31 enthalten, so erkennt man im wesentlichen drei neu hinzukommende Fragmente von mittlerer Intensität: m/e 253(M-H₂O), m/e 256(M-CH₃) und m/e 157. Das Zustandekommen von m/e 253 ist aus der Struktur von 31 nicht ohne eine vorhergehende Umlagerung des Molekülions erklärbar. Der Mechanismus dieser unerwartet ausgeprägten Fragmentierungsreaktion erschien uns daher von besonderem Interesse.

2.5.1.7.1. H₂O-Eliminierung aus dem Molekülion: Herkunft der Atome, die in das Wassermolekül inkorporiert werden

Zunächst war zu klären, welches Sauerstoffatom und welche beiden Wasserstoffatome an der Wassereliminierung beteiligt sind. Die Massenspektren spezifisch isotoopenmarkierter Verbindungen, die zu diesem Zweck synthetisiert werden mußten, sollten hierüber Aufschluß geben. Gleichzeitig sollte auf diesem Wege die Beantwortung der Frage möglich sein, ob es sich hierbei um einen spezifischen Prozeß handelt, ob also z.B. ein einziges Sauerstoffatom in Frage kommt, oder ob eine Überlagerung verschiedener Mechanismen vorliegt, an denen unterschiedliche Sauerstoffatome beteiligt sein könnten.

Als Lieferant für das Sauerstoffatom des eliminierten Wassermoleküls kam die Carbonylgruppe des Ringsystems in Betracht. Ein entsprechender Beweis konnte im Falle des 4-Methoxyphenoxazons 30 durch ¹⁸O-Markierung der Carbonylfunktion bereits geführt werden (S.54). Dort trat das Fragment M-H₂O

jedoch nur mit minimaler Intensität im Spektrum auf (Fragment e) und zerfiel aufgrund geringer Stabilität unter Abspaltung von CO weiter, während die Abspaltung von Wasser aus dem Molekölion von 31 offenbar zu einem sehr stabilen Fragment führt. Das Massenspektrum der in der Carbonylgruppe spezifisch ^{18}O -markierten Verbindung 38a ist in Abb.38 wiedergegeben:

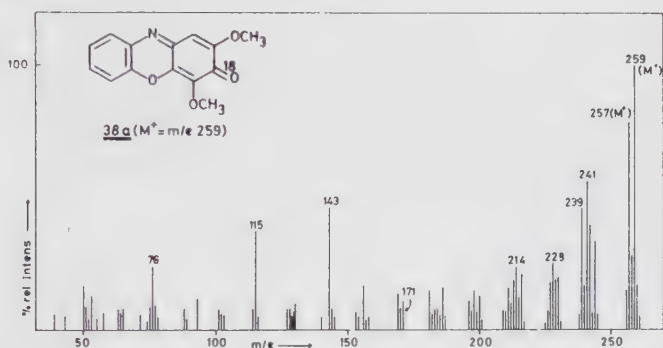


Abb.38: Massenspektrum von 2,4-Dimethoxy- ^{18}O -phenoxazon (38a, $M^+=m/e$ 259, 55%) neben unmarkiertem 38 ($M^+=m/e$ 257, 45%)

Der Befund ist äußerst überraschend: Die gesamte ^{18}O -Markierung des Moleküls bleibt nach Eliminierung des Wassermoleküls im Fragment erhalten (m/e 241!). Das Sauerstoffatom der Carbonylgruppe wird also nicht in die abgespaltene Elementkombination eingebaut!

Es verbleiben drei in Etherbindung vorliegende Sauerstoffatome, deren Beteiligung an einem massenspektrometrischen Wasserverlust völlig unerwartet ist. Die Sauerstoffatome der beiden Methoxygruppen konnten von uns spezifisch ^{18}O -markiert werden: Die Massenspektren der synthetisierten Verbindungen 31a und 38b zeigt Abb.39. Für 31a findet man einen Markierungs-

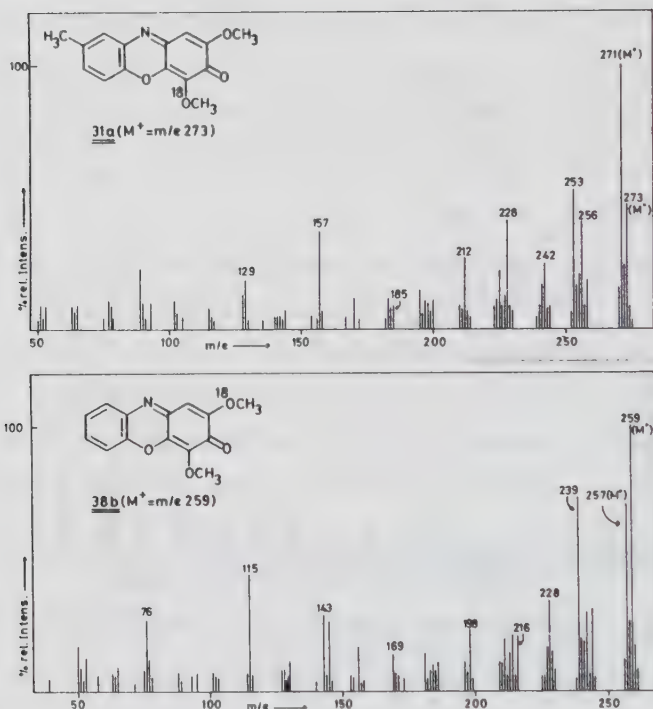


Abb.39: Massenspektren von

- a) 2-Methoxy-4-[¹⁸O]Methoxy-8-methylphenoxazon (31a,
(M⁺=m/e 273, 30%) neben unmarkiertem 31 (M⁺=m/e 271, 70%)
b) 2-[¹⁸O]Methoxy-4-methoxyphenoxazon (38b, M⁺=m/e 259, 57%)
neben unmarkiertem 38 (M⁺=m/e 257, 43%)

grad von 26% im Fragment (m/e 255) gegenüber 30% im Molekülion: Das Sauerstoffatom der Methoxygruppe an C-4 ist also an der Wassereliminierung weitgehend unbeteiligt. Eine andere Situation trifft man im Spektrum von 38b an: Das Molekülion ist hier zu 57% ¹⁸O-markiert, während das Fragment nur noch eine Anreicherung von 18% aufweist (m/e 241). Das Sauerstoffatom der Methoxy-

gruppe an C-2 muß demnach ganz überwiegend in das abgespaltene Wassermolekül eingebaut werden. Die Tatsache, daß das Fragment noch einen restlichen ^{18}O -Gehalt von ca. 18% aufweist, läßt ferner erkennen, daß noch weitere Sauerstoffatome - in untergeordneten Nebenreaktionen - an dem untersuchten Fragmentierungsschritt beteiligt sein können.

Als Quelle für die beiden Wasserstoffatome des eliminierten Wassermoleküls zogen wir die zwei Methoxygruppen sowie das H-Atom an C-1 des Phenoxazon-ringsystems in Betracht, da die Wasserstoffatome am Ring A weit vom Sauerstoffatom der Methoxyfunktion an C-2 entfernt liegen. Zur experimentellen Überprüfung dieser Möglichkeiten synthetisierten wir die drei deuteriummarkierten Verbindungen $\underline{\underline{31b}}$, $\underline{\underline{31c}}$ und $\underline{\underline{31d}}$, deren Massenspektren Abb.40 wiedergibt. Der Markierungsgrad im Molekölion von $\underline{\underline{31b}}$ bleibt im Fragment voll erhalten (m/e 254). Das 1-H wird also im Zuge der Wasserabspaltung nicht eliminiert.

Die Deuteriummarkierung der Methoxyfunktion an C-2 gelang quantitativ ($\underline{\underline{31c}}$). Während die Entstehung von m/e 255 nur durch HDO-Verlust aus dem Molekölion erklärbar ist (-19ME), sind für das Zustandekommen von m/e 256 (-18ME) zwei Interpretationen möglich: zum einen könnte - gegenüber $\underline{\underline{31}}$ unverändert - Wasser abgespalten worden sein, zum anderen ist an die Eliminierung eines CD_3 -Radikals zu denken. Durch hochaufgelöste Messungen konnte diese Frage entschieden werden (Tab.4,S.63). Demnach entsteht das Fragment m/e 256 ausschließlich durch Verlust eines CD_3 -Radikals aus dem Molekölion von $\underline{\underline{31c}}$, während die Abspaltung von H_2O aus dem Molekölion von $\underline{\underline{31}}$ quantitativ in einen Verlust von HDO bei $\underline{\underline{31c}}$ übergeht. Die Methoxyfunktion an C-2 liefert also eines der beiden Wasserstoffatome des eliminierten Wassermoleküls. Die Fragmente m/e 255 und 256 treten auch im Spektrum von $\underline{\underline{31d}}$ auf. Hoch-

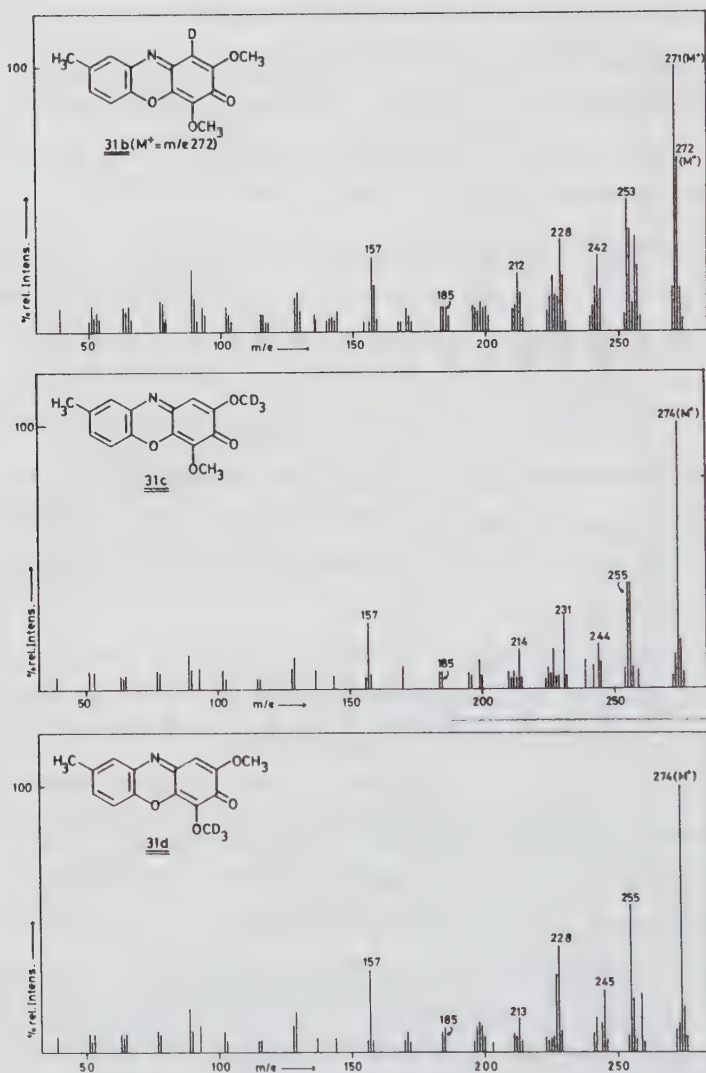


Abb. 40: Massenspektren von

- 2,4-Dimethoxy-8-methyl-1-[1-D]phenoxazon (31b, $M^+ = m/e$ 272) neben unmarkiertem 31 ($M^+ = m/e$ 271)
- 2-[D₃]Methoxy-4-methoxy-8-methylphenoxazon (31c)
- 2-Methoxy-4-[D₃]methoxy-8-methylphenoxazon (31d)

nominale Masse	exakte Masse	Elementarzus.setzung	Bemerkung
255	255,0866	$C_{15}H_9D_2NO_3$	M-H $\underline{D}$ O
256	256,0609(80%)	$C_{14}H_{10}NO_4$	M-CD $\underline{3}$
	256,0892(20%)	$^{12}C_{14}^{13}CH_9D_2NO_3$	^{13}C -Isotopen- peak v.m/e 255

Tab.4: MS von $\underline{\underline{31}}c$: hochaufgelöste Messung von m/e 255 und m/e 256

aufgelöste Messungen führen zum gleichen Ergebnis wie im Falle von $\underline{\underline{31}}c$. Das zweite der beiden gesuchten Wasserstoffatome steuert also die Methoxygruppe an C-4 zum eliminierten Wassermolekül bei.

2.5.1.7.2. Fazit von Kap. 2.5.1.7.1.

1. Die Wasserabspaltung aus dem Molekölion von $\underline{\underline{31}}$ ist ein spezifischer Fragmentierungsprozeß. Durch Isotopenmarkierungen konnten die beteiligten Atome eindeutig identifiziert werden: Die beiden Methoxyfunktionen an C-2 und C-4 steuern jeweils ein Wasserstoffatom bei; das Sauerstoffatom, welches in das eliminierte Wassermolekül eingebaut wird, entstammt ganz überwiegend der Methoxyfunktion an C-2 (Abb.41).
2. Auch im Falle des 4-Methoxyphenoxazons $\underline{\underline{30}}$ war die Bildung eines Fragmentes M-H $\underline{2}$ O beobachtet worden, dessen relative Intensität allerdings sehr gering ist (Fragment e, S.55). Es ist jedoch interessant festzustellen, daß es sich hierbei bezüglich der beteiligten Atome und damit auch des Fragmentierungsmechanismus um einen völlig anderen Prozeß handelt, wie durch Markierungsexperimente bewiesen werden konnte: Beteiligt sind das Sauerstoffatom der Carbonylgruppe und zwei Wasserstoffatome der Methoxygruppe an C-4 (Abb.41).

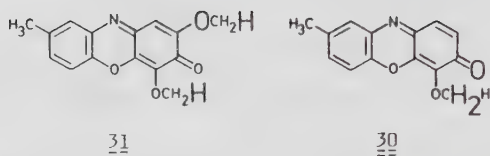


Abb.41: H_2O -Abspaltung aus den Molekülonen von $\underline{\underline{30}}$ und $\underline{\underline{31}}$: Kennzeichnung der Atome, aus denen das eliminierte Wassermolekül zusammengesetzt ist.

2.5.1.7.3. Literaturanalogien zur H_2O -Abspaltung aus den Molekülonen von 2,4-Dimethoxyphenoxazonen

Massenspektrometrische Wassereliminierungen unter Beteiligung von Sauerstoffatomen in Etherbindung sind in der Literatur weitgehend unbekannt. Diese Feststellung gilt insbesondere, wenn man die hohe relative Intensität des Fragmentes $\text{M}-\text{H}_2\text{O}$ berücksichtigt, wie sie von uns im Falle der Spektren von 2,4-Dimethoxyphenoxazonen aufgefunden wurde. Bei der Untersuchung der Massenspektren verschiedener Methoxynaphtho- und Methoxyanthrachinone fand man in einigen Fällen eine schwache Wasserabspaltung bzw. die Abspaltung eines OH-Radikals aus den Molekülonen. Tab.5 enthält die beobachteten relativen Intensitäten der entsprechenden Fragmentionen von 2-Methoxynaphthochinon($\underline{\underline{40}}$), 5-Methoxynaphthochinon($\underline{\underline{41}}$), 1-Methoxyanthrachinon($\underline{\underline{42}}$) und 2-Methoxyanthrachinon($\underline{\underline{43}}$)⁹⁵. Nach diesen Ergebnissen ist offensichtlich das Vorliegen einer zur Carbonylfunktion peri-ständigen Methoxygruppe für das Auftreten solcher Prozesse erforderlich. Die Autoren nehmen an, daß jeweils das Sauerstoffatom der Carbonylfunktion benachbart zur Methoxygruppe sowie die Wasserstoffatome der Methoxygruppe in das abgespaltene Teilchen eingebaut werden. ¹⁸O-Markierungsexperimente zur Überprüfung dieser Hypothese wurden

<u>40</u>	<u>41</u>	<u>42</u>	<u>43</u>
M-OH 0%	0%	9%	0%
M-H ₂ O 0%	11%	9%	0%

Tab.5: relative Intensitäten der Fragmente M-OH und M-H₂O in den Massenspektren von 40-43 nach ⁹⁵⁾

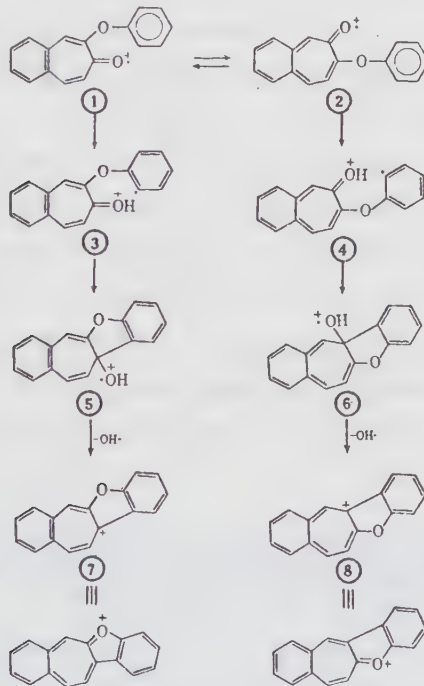
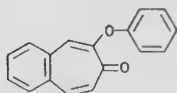


Abb.42: Abspaltung eines OH-Radikals aus dem Molekölion von 44: Vorschlag für den Fragmentierungsmechanismus und die Struktur des Fragmentes nach ⁴²⁾

allerdings nicht durchgeführt.

Interessante Untersuchungen liegen zur MS-Fragmentierung von 2-Phenoxy-
-4,5-benzotropon(44) vor⁴²⁾. Im Massenspektrum dieser Verbindung beobachtet



44

man die ebenfalls völlig unerwartete Abspaltung eines
OH-Radikals aus dem Molekülion. Das Fragment M-OH
tritt mit einer relativen Intensität von immerhin
25% auf. Zur Aufklärung dieser MS-Fragmentierungs-
reaktion wurden beide Sauerstoffatome des Moleküls

spezifisch ¹⁸O-markiert. Wie die Massenspektren dieser Spezies zeigten, ist
die Herkunft des beteiligten Sauerstoffatoms nicht einheitlich, sondern es
stammt zu etwa gleichen Anteilen aus Carbonylgruppe und Etherfunktion.

Das Wasserstoffatom - auch das konnte durch Isotopenmarkierung bewiesen
werden - wird von den ortho-Positionen des Phenylringes geliefert. Die Auto-
ren schlagen aufgrund ihrer Untersuchungen den in Abb.42 wiedergegebenen
Fragmentierungsmechanismus vor (S.65). Zur Erklärung der Tatsache, daß
beide Sauerstoffatome zu gleichen Teilen in das eliminierte OH-Radikal
eingebaut werden, nehmen die Autoren eine schnelle Äquilibration zwischen
den Ionen (1) und (2) an, die unter einer 1,4-Wanderung des Phenylrestes
verläuft.

2.5.1.7.4. Bildung des Fragmentes M-H₂O in den Massenspektren von 2,4-Dimethoxyphenoxazonen: Vorschlag für den Fragmentierungs- mechanismus und die Struktur des Fragmentions

Im Gegensatz zu den Befunden an 44 ist das Sauerstoffatom der Carbonyl-
gruppe von 2,4-Dimethoxyphenoxazonen nicht Bestandteil des eliminierten
Wassermoleküls, wie aus dem Spektrum von 38a (S.59) eindeutig hervorgeht.
Es liegt jedoch nahe, der Carbonylfunktion eine entscheidende Rolle im

Mechanismus der Umlagerung des Moleküliions zuzuordnen, die der Wasserabspaltung vorausgehen muß. Unter Berücksichtigung unserer Ergebnisse aus den Spektren der spezifisch isotoopenmarkierten 2,4-Dimethoxyphenoxazone schlagen wir daher den in Abb.43 wiedergegebenen Fragmentierungsmechanismus vor:

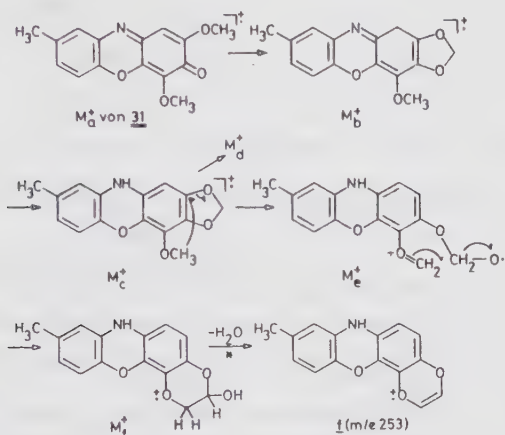


Abb.43: Bildung des Fragmentes M-H₂O beim MS-Zerfall von 31: Vorschlag für den Fragmentierungsmechanismus und die Struktur des Fragmentions (f).

Die Umlagerung des Moleküliions von 31 zu den Strukturen M_b⁺, M_c⁺ und M_d⁺ unter H-Transfer aus der Methoxygruppe an C-2 auf das Ringsystem entspricht unseren Vorschlägen für die Umlagerung im Molekülion des 2-Methoxyphenoxazons 29 (S.49). Die Anwesenheit der Methoxygruppe an C-4 erlaubt dagegen die Formulierung eines Konkurrenzmechanismus, der - ausgehend von M_c⁺ - zu einer Umlagerung des Moleküliions in die Strukturen M_e⁺ und M_f⁺ führt. Im Zuge der Umlagerung von M_c⁺ nach M_e⁺ formulieren wir einen H-Transfer aus der Methoxy-

gruppe an C-4 auf das C-2 des Ringsystems. Wasserstoffwanderungen, die auch über größere Distanzen zwischen räumlich nicht unmittelbar benachbarten Molekülteilen ablaufen, sind literaturbekannt⁹⁶⁾. Radikalkationenstrukturen, die mit M_e^+ vergleichbar sind, wurden für die MS-Fragmentierung cyclischer Ether formuliert⁹⁷⁾. Aus Struktur M_f^+ diskutieren wir die Abspaltung eines Moleküls Wasser unter Bildung des Fragmentes f ($M-H_2O$). Dieser Mechanismus trägt den Befunden aus den Spektren der isotoopenmarkierten 2,4-Dimethoxyphenoxazone Rechnung, da die OH-Gruppe in M_f^+ das Sauerstoffatom und eines der Wasserstoffatome der Methoxyfunktion an C-2 von M_a^+ enthält und das zweite Wasserstoffatom des abgespaltenen Wassermoleküls der Methoxygruppe an C-4 von M_a^+ entstammt.

Struktur f ist gut vereinbar mit der relativ hohen Stabilität des Fragmentes $M-H_2O$ (geringe Tendenz zu Folgezerfällen), wie ein Vergleich mit



45

der Stabilität und der geringen Fragmentierungstendenz des Molekülions von Benzodioxin(45) zeigt⁹⁸⁾.

Um unseren Vorschlag für den Fragmentierungsmechanismus

dieses unerwarteten massenspektrometrischen Zerfallspro-

zesses abzusichern, haben wir die Massenspektren weiterer geeignet substituierter Phenoxazone aufgenommen und interpretiert. Über diese Untersuchungen wird später noch berichtet. Zunächst soll jedoch die Diskussion des MS-Zerfalles von 31 vervollständigt werden, um ein Fragmentierungsschema für diese Verbindung aufstellen zu können.

2.5.1.7.5. Aufstellung eines Fragmentierungsschemas für den MS-Zerfall von 2,4-Dimethoxyphenoxazonen am Beispiel von 31

Um die Genese der - neben Fragment f - wesentlichen Ionen im MS von 31 besser erhellen zu können, haben wir zusätzlich zu den bereits beschrie-

benen isotoopenmarkierten Verbindungen das Spektrum der ^{13}C -markierten Spezies $\underline{\underline{31e}}$ (Abb.44) herangezogen.

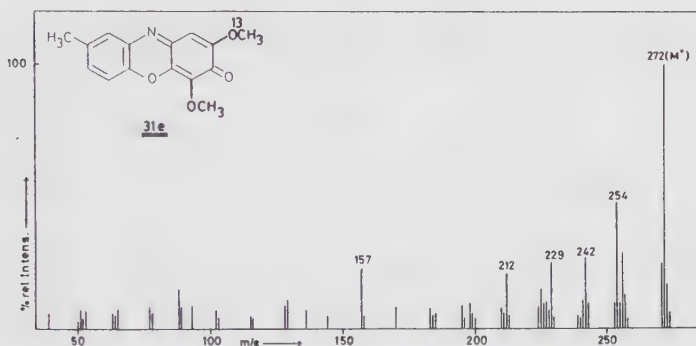


Abb.44: Massenspektrum von
2-[^{13}C]Methoxy-4-methoxy-8-methylphenoxazon ($\underline{\underline{31e}}$)

Das Fragment $\text{M}-\text{CH}_3$

Aus den Spektren der deuteriummarkierten Verbindungen $\underline{\underline{31c}}$ und $\underline{\underline{31d}}$ (S.62) geht eindeutig hervor, daß die Genese der Fragmentes $\text{M}-\text{CH}_3$ im Spektrum von $\underline{\underline{31}}$ (S.57) nicht einheitlich ist: Der überwiegende Teil dieses Ions entsteht offensichtlich durch Abspaltung eines Methylradikals aus der Methoxygruppe an C-2. Dies beweist die unveränderte Lage dieses Ions bei m/e 256 im Spektrum von $\underline{\underline{31c}}$. (Siehe dazu das Ergebnis der hochaufgelösten Messung auf S.63.) Ein kleinerer Anteil des Fragmentes $\text{M}-\text{CH}_3$ in $\underline{\underline{31}}$ kommt jedoch auch durch entsprechenden Verlust aus der Methoxyfunktion an C-4 zustande, wie das Fragment bei m/e 259 ($\text{M}-\text{CH}_3$) im Spektrum von $\underline{\underline{31c}}$ beweist.

Das Spektrum von $\underline{\underline{31d}}$ bestätigt diesen Befund: Auch hier treten zwei Ionen bei m/e 256 und m/e 259 auf, wobei jetzt aber das Fragment m/e 259 - entsprechend dem Verlust eines Methylradikals aus der Methoxygruppe an C-2 -

die höhere Intensität aufweist. Wir schlagen für das Fragment $M-CH_3$ im MS von 31 die Strukturen c und g vor (Abb.45):

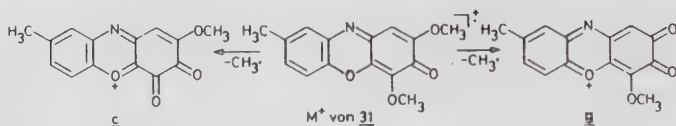


Abb.45: Zusammensetzung des Fragmentes $M-CH_3$ im MS von 31 aus den Strukturen c und g (Vorschlag).

Die geringere Stabilität des Fragmentes c muß in Analogie zum Spektrum des 4-Methoxyphenoxazons 30 (S.53) gesehen werden: unter CO-Eliminierung zerfällt das Ion weiter zum Fragment d (m/e 228 im Spektrum von 31). Fragment g erleidet dagegen offenbar keinen CO-Verlust (erkennbar am Fehlen des Ions m/e 231 im Spektrum von 31d) und ist damit wegen seiner größeren Stabilität Hauptbestandteil des Ions $M-CH_3$ im MS von 31.

Das Fehlen des Fragmentes g im Spektrum des 2-Methoxyphenoxazons 29 begründen wir mit der konkurrierenden und äußerst bevorzugten Abspaltung eines CHO -Radikals aus dieser Methoxygruppe (S.49).

Das Fragment m/e 157

Dieses Fragment ist in den Spektren von 31 und 38 mit mittlerer Intensität vertreten (S.57), fehlt jedoch in den Spektren von Michigazon(27) und dessen Acetylderivat(39). Der generelle analytische Wert dieses Ions für die Identifizierung eines 2,4-Dimethoxyphenoxazons ist daher gering. Aufgrund der Spektren der verschiedenen isotoopenmarkierten Substanzen muß seine Genese aus dem Fragment d formuliert werden (Abb.46):

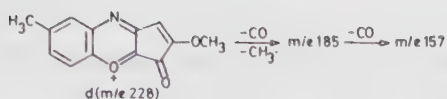


Abb.46: Entstehung des Ions $m/e\ 157$ im MS von 31

Fragmentierungsreaktionen, die bereits aus den Spektren von 29 und 30 bekannt sind

Das MS von 31 zeigt auch den Ablauf von Fragmentierungsreaktionen an, die bereits beim MS-Zerfall des 2-Methoxyphenoxazons 29 und des 4-Methoxyphenoxazons 30 beobachtet wurden: Sie äußern sich im Spektrum von 31 durch eine Verschiebung der entsprechenden Fragmente um 30ME (entsprechend einer zusätzlichen Methoxygruppe).

Fragment b(m/e 242) geht in Analogie zu dem ausgeprägten Verlust eines CHO-Radikals aus dem Molekülion von 29 überwiegend durch einen entsprechenden Verlust aus der Methoxygruppe an C-2 von 31 hervor, wie die Spektren von 38b, 31c und 31e beweisen (S.60,62,69).

Die Entstehung von Fragment d aus dem Ion c wurde bereits besprochen. Dieser Zerfallsprozeß ist aus dem Spektrum von 30 bekannt. Anhand der Lage von d ($m/e\ 228$ in 31) in den Spektren von 38b, 31a, 31c und 31d ist seine Genese durch Abbau der Methoxygruppe an C-4 ebenfalls gesichert.

Durch Verlust eines Moleküls Formaldehyd aus einer der beiden Methoxygruppen (dieser Prozeß tritt in den Spektren von 29 und 30 ebenfalls auf) entsteht das Ion $m/e\ 241$, dessen Struktur sich nach unserer Interpretation aus den Strukturen der Molekülionen von 29 und 30 zusammensetzt. Damit ist die Beobachtung im Einklang, daß die Folgefragmente dieser Ionen (vgl. die Fragmentierungsschemata auf S.50 u.55) auch im Spektrum von 31 auftreten.

Für den MS-Zerfall von 31 kommen wir als Ergebnis unserer Analysen zu dem in Abb.47 wiedergegebenen Fragmentierungsschema:

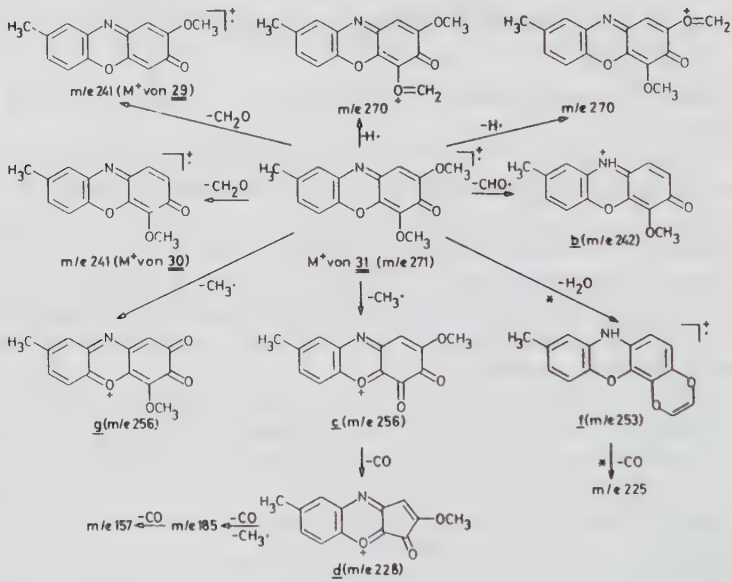


Abb.47: Fragmentierungsschema für den MS-Zerfall von 31

2.5.1.8. Fazit von Kap.2.5.1.7.

1. Charakteristikum für den MS-Zerfall der untersuchten 2,4-Dimethoxyphenoxazone ist das Auftreten des Fragmentes f ($M-H_2O$), das nach der Molekülion zweitstärkstes Fragment im Spektrum ist.
2. Die für das 2-Methoxyphenoxazon 29 und das 4-Methoxyphenoxazon 30 charakteristischen Fragmente b und d treten auch in den Spektren der 2,4-Dimethoxyphenoxazone auf. Ihre Intensitäten sind jedoch wesentlich geringer als diejenige des charakteristischen Fragmentes f.

3. Die Herkunft der an der Eliminierung von Wasser aus dem Molekülion beteiligten Atome konnte durch Analyse spezifisch isotoopenmarkierter Verbindungen eindeutig geklärt werden. Dabei stellte sich überraschend heraus, daß das Sauerstoffatom der Methoxygruppe an C-2 im wesentlichen in das eliminierte Wassermolekül eingebaut wird. Die Beteiligung eines Sauerstoffatoms in Etherbindung an einem solchen Fragmentierungsprozeß - zumal im Zusammenhang mit der Bildung eines derart intensiven Fragmentions - muß als massenspektrometrische Rarität angesehen werden.
4. Die Fragmentierungsprozesse, die zu den Fragmenten $M-H_2O$ in den Spektren von 2,4-Dimethoxyphenoxazonen und 4-Methoxyphenoxazonen führen, sind nicht miteinander verwandt: während im erstgenannten Falle Fragment f mit charakteristischer Intensität gebildet wird, entsteht im anderen Falle Fragment e, dessen Intensität jedoch sehr gering und ohne analytischen Wert für die massenspektrometrische Erkennung von 4-Methoxyphenoxazonen ist.

2.5.2. Strukturelle Randbedingungen für das Auftreten eines signifikanten Fragmentes $M-H_2O$ in den Massenspektren von Phenoxazonen

2.5.2.1. Die Massenspektren von 1,4-Dimethoxy-8-methylphenoxazon(46) und 1,2-Dimethoxy-8-methylphenoxazon(47)

Die interessante und unerwartete Wasserabspaltung aus den Molekülionen von 2,4-Dimethoxyphenoxazonen hat uns zu weiteren massenspektrometrischen Untersuchungen veranlaßt. Es war zu klären, ob für das Auftreten eines signifikanten Fragmentes $M-H_2O$ das Vorliegen einer 2,4-Dimethoxystruktur Voraussetzung ist - wie man aufgrund des von uns vorgeschlagenen Fragmentierungsmechanismus (S.67) erwarten muß - oder ob isomere Dimethoxy-Strukturen ebenfalls zu diesem Fragmentierungsschritt Anlaß geben. Wir synthetisierten daher

das 1,4-Dimethoxyphenoxazon 46 und das 1,2-Dimethoxyphenoxazon 47, deren Massenspektren Abb.48 wiedergibt:

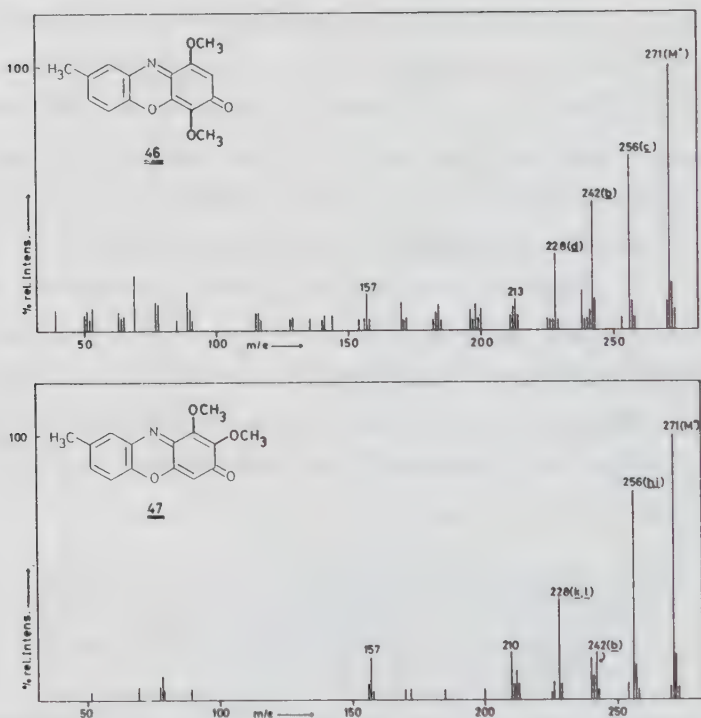


Abb.48: Massenspektren von 1,4-Dimethoxy-8-methylphenoxazon(46) und 1,2-Dimethoxy-8-methylphenoxazon(47)

Die Erwartung wird durch die Spektren bestätigt: während im Spektrum von 47 ein Fragment $M-H_2O$ völlig fehlt, muß die äußerst geringe Intensität dieses Ions im Spektrum von 46 mit dem Vorliegen der Struktur e (in Analogie zum 4-Methoxyphenoxazon 30) erklärt werden.

Die Spektren beider Verbindungen sind durch intensive Fragmente $M-CH_3$ ge-

kennzeichnet. Für 46 kommt man nach Eliminierung eines Methylradikals aus der Methoxygruppe an C-4 zur Struktur c für dieses Fragment (vgl.S.53). Da keine Isotopenmarkierungsexperimente vorliegen, muß die Abspaltung eines Methylradikals aus der Methoxygruppe an C-1 von 46 jedoch ebenfalls in Betracht gezogen werden, zumal die Stabilität des Fragmentes viel höher ist, als nach den Befunden aus den Spektren von 30 und 31 für c erwartet werden kann (S.53 u. 70).

Für das Fragment $M-CH_3$ im Spektrum von 47 schlagen wir die zu c analogen Strukturen h und i vor (Abb.49):

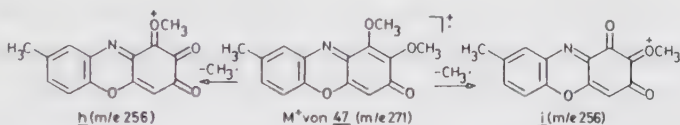


Abb.49: Zusammensetzung des Fragmentes $M-CH_3$ im MS von 47 aus den Strukturen h und i (Vorschlag).

Eine Ionenstruktur, die zu h und i analog ist, wird auch für das Fragment $M-CH_3$ im Spektrum von Brenzcatechindimethylether formuliert⁹⁹⁾.

Die Fragmente m/e 242 und m/e 228 entstehen infolge bekannter Prozesse: Durch Abspaltung eines CHO-Radikals aus den Moleküllonen entsteht das Fragment b(m/e 242), durch Eliminierung von CO aus c entsteht das Ion d (analog aus h und i die Ionen k und l, Abb.50).

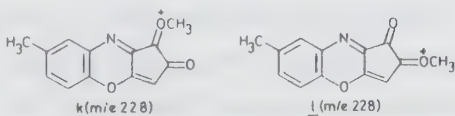


Abb.50: Zusammensetzung des Fragmentes m/e 228 im MS von 47 aus den Strukturen k und l (Vorschlag).

2.5.2.2. Fazit von Kap.2.5.2.1.

1. Das Auftreten eines signifikanten Fragmentes $M-H_2O$ wird im Gegensatz zu den untersuchten 2,4-Dimethoxyphenoxazonen in den Spektren der 1,4- bzw. 1,2-Dimethoxyphenoxazone 46 und 47 nicht beobachtet.
2. Kennzeichnend für den MS-Zerfall von 46 und 47 sind intensive Fragmente $M-CH_3$. Der analytische Wert dieser Ionen ist allerdings trotzdem gering, da die Abspaltung eines Methylradikals aus Verbindungen mit Methoxygruppen eine sehr häufig anzutreffende Fragmentierungsreaktion ist.
3. Durch die Entstehung der Ionen k und l tritt im Spektrum des 1,2-Dimethoxyphenoxazons 47 ein Fragment $M-(CH_3+CO)$ auf, wie wir es bisher nur bei Phenoxazonen mit einer Methoxygruppe an C-4 beobachtet hatten (Verbindungen 30, 31, 46).

2.5.2.3. Das Massenspektrum von 2,4-Dimethoxy-3-hydroxy-8-methylphenoxazin(48)

Durch Reduktion von Phenoxazonen gelangt man zu den entsprechenden 3-Hydroxyphenoxazinen, die sehr leicht (z.B. bereits an der Luft) zu den Phenoxazonen rückoxydiert werden (vgl.S.28)⁷⁸⁾. Aus dem 2,4-Dimethoxyphenoxazon 31 haben wir das Phenoxazin 48 dargestellt, um zu überprüfen, ob auch diese Verbindung aufgrund ihrer strukturellen Verwandtschaft zu den 2,4-Dimethoxyphenoxazonen ein signifikantes Fragment $M-H_2O$ im Massenspektrum aufweist. Aus Abb.51 geht jedoch eindeutig hervor, daß dies nicht der Fall ist. Damit ist der Beweis erbracht, daß das Vorliegen des chinoiden Ringes C der Phenoxazone eine wichtige Voraussetzung für die Bildung des Fragmentes f darstellt. Dieser Befund stützt den von uns vorgeschlagenen Mechanismus der Bildung dieses Ions, in dem die Carbonylgruppe des Phenoxazonringsystems eine wichtige Rolle spielt (vgl.S.67).

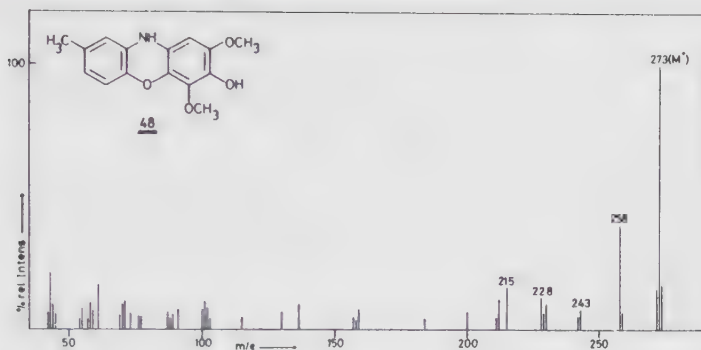


Abb.51: MS von 2,4-Dimethoxy-3-hydroxy-8-methylphenoxazin(48)

Während die Massenspektren einzelner 3-Hydroxyphenothiazine publiziert wurden⁵⁶⁾, liegen Untersuchungen zum MS-Zerfall von 3-Hydroxyphenoxazinen bisher nicht vor. Eine nähere Analyse der Spektren unterschiedlich substituierter Vertreter dieser Substanzklasse ist jedoch nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

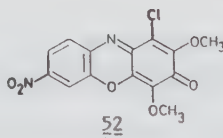
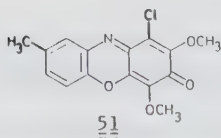
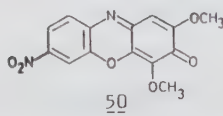
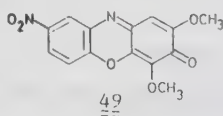
2.5.2.4. Einfluß zusätzlicher Substituenten auf den MS-Zerfall von 2,4-Dimethoxyphenoxazonen: Nitrogruppen und Chloratome

Es hatte sich gezeigt, daß der Charakter der MS-Fragmentierung von 2,4-Dimethoxyphenoxazonen durch die Unterschiedlichkeit der Substituenten an C-8 von 27(Michigazon), 31, 38 und 39 (vgl.S.57) nicht beeinflußt wird. Sogar die relativen Intensitäten einander entsprechender Fragmente bleiben nahezu identisch. Bei der Untersuchung des massenspektrometrischen Fragmentierungsverhaltens von Phenoxazinen stellte sich demgegenüber heraus, daß Nitro- und Halogensubstituenten deutliche Veränderungen des MS-Zerfalls verursachen. Vor allem spielen hier zusätzliche Fragmentierungsprozesse unter Beteiligung von Atomen der Nitrogruppen eine Rolle⁵²⁾.

Unser nächstes Ziel war, zu prüfen, welche Effekte durch das Einführen von Nitro- und Halogensubstituenten in die Ringe A und C der 2,4-Dimethoxyphenoxazone auf deren Fragmentierungsverhalten ausgehen. Dabei ging es uns insbesondere um die Klärung der folgenden Fragen:

1. Welche Abhängigkeit läßt sich zwischen der relativen Intensität des Fragmentes f ($M-H_2O$) und Art, Anzahl sowie Position der zusätzlich eingeführten Substituenten ableiten?
2. Welche neuen Fragmente bzw. Folgefragmentierungen werden evtl. durch diese Substituenten hervorgerufen?

In diesem Zusammenhang diskutieren wir im folgenden die Spektren der Phenoxazone 49-52.



2.5.2.4.1. Die Massenspektren von 2,4-Dimethoxy-8-nitrophenoxazon(49) und 2,4-Dimethoxy-7-nitrophenoxazon(50)

Die Massenspektren der Nitrophenoxazone 49 und 50 sind - abgesehen von minimalen Intensitätsunterschieden einzelner Fragmente - identisch. Abb.52 gibt stellvertretend für beide Verbindungen das Massenspektrum von 50 wieder. Auffallend ist die starke Steigerung der relativen Intensität des Frag-

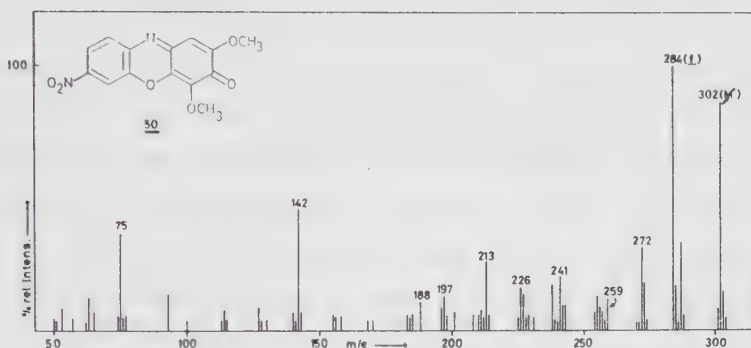


Abb.52: MS von 2,4-Dimethoxy-7-nitrophenoxazon(50)

menten f gegenüber den Spektren von 31 und 38 (vgl.S.57): Es übertrifft die Intensität des Moleküliions und wird zum base peak! Zwei Ursachen können für die Steigerung der relativen Intensität von f verantwortlich sein:

1. Die Sauerstoffatome der Nitrogruppe könnten an der Eliminierung eines Moleküls Wasser aus dem Molekülion von 50 mit beteiligt sein.
2. Die Steigerung der Intensität von f gegenüber dem Molekülion beruht auf der stark elektronenziehenden Wirkung der Nitrogruppe.

Die erstgenannte Ursache schließen wir aus folgenden Gründen aus:

Typisch für die Fragmentierung aromatischer Nitroverbindungen ist die Abspaltung von NO und NO₂¹⁰⁰⁻¹⁰²). Räumlich benachbarte Wasserstoffatome ermöglichen darüberhinaus in einzelnen Fällen die Eliminierung von HNO₂ oder auch OH⁵⁹). Da diese Parameter im Falle des Phenoxazons 50 nicht gegeben sind, erscheint eine Wasserabspaltung aus dem Molekülion unter Einbau der Sauerstoffatome der Nitrogruppe an C-7 äußerst unwahrscheinlich.

Wir gehen daher davon aus, daß die Genese von f gegenüber 31 unverändert verläuft und daß die Steigerung der relativen Intensität des Fragmentes

im Spektrum von 50 auf dem elektronischen Effekt der Nitrogruppe beruht; derartige Substituenteneffekte sind beschrieben worden¹⁰³⁾. Im vorliegenden Falle kommen wir zu der folgenden Interpretation des experimentellen Befundes: Die Bindung zwischen dem Sauerstoffatom der Methoxygruppe an C-2 und dem Ringkohlenstoffatom, die im Zuge der Wasserabspaltung aus dem Molekülion gespalten werden muß, wird durch die elektronenziehende Wirkung der Nitrogruppe geschwächt, so daß es zu einem erleichterten Ablauf der Fragmentierungsreaktion und zu einer Destabilisierung des Molekülions kommt.

Der Einfluß der Nitrogruppe auf den Gesamtcharakter des Spektrums eines 2,4-Dimethoxyphenoxazons bleibt jedoch gering. Das Fragment m/e 272 ($M^+ - 30ME$) entsteht - wie das Ergebnis der hochaufgelösten Messung zeigt - ausschließlich durch Abspaltung von Formaldehyd aus dem Molekülion. Eine für aromatische Nitrogruppen charakteristische Abspaltung von NO wird also nicht beobachtet. Einige gegenüber dem MS von 38 neu hinzukommende Ionen entstehen aber durch NO_2 -Abspaltung aus bereits bekannten Fragmenten, wie ebenfalls durch hochaufgelöste Messungen belegt wurde. Tab.6 gibt eine Zusammenfassung dieser Fragmente:

Tochterion im MS von <u>50</u>	Mutterion im MS von <u>50</u> (entsprechendes Ion im MS von <u>38</u>)
m/e 241	m/e 287 (m/e 242= <u>c</u> , <u>g</u>)
m/e 238	m/e 284 (m/e 239= <u>f</u>)
m/e 213	m/e 259 (m/e 214= <u>d</u>)
m/e 142	m/e 188 (m/e 143)

Tab.6: NO_2 -Abspaltungen im MS von 50

2.5.2.4.2. Das Massenspektrum von 1-Chlor-2,4-dimethoxy-8-methylphenoxazon(51)

Abb.53 gibt das Massenspektrum des Chlorphenoxazons 51 wieder. Offensichtlich wird - wie bei den Nitroverbindungen 49 und 50 - das Molekölion durch den elektronenziehenden Substituenten an C-1 destabilisiert und die Bildung von Fragment f begünstigt.

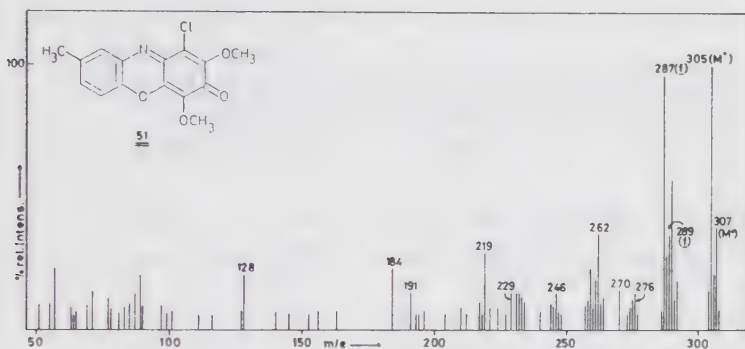


Abb.53: MS von 1-Chlor-2,4-dimethoxy-8-methylphenoxazon(51)

Die Abspaltung eines Chlorradikals aus dem Molekölion ist als Konkurrenzreaktion nur von untergeordneter Bedeutung (Fragment m/e 270). Die Bildung des Fragmentes m/e 184 erklären wir durch die Eliminierung eines Chlorradikals aus m/e 219/21 (entspricht m/e 185 im Spektrum von 31, S.57). Durch zweimalige Abspaltung von CO aus m/e 184 kommt man zum Fragment m/e 128.

2.5.2.4.3. Das MS von 1-Chlor-2,4-dimethoxy-7-nitrophenoxazon(52)

Das Massenspektrum von 52 (Abb.54) ergänzt die Befunde aus den Spektren von 49, 50 und 51 in der erwarteten Weise, denn durch das Vorhandensein von Nitrogruppe und Halogenatom tritt eine Summierung der bereits beobachteten

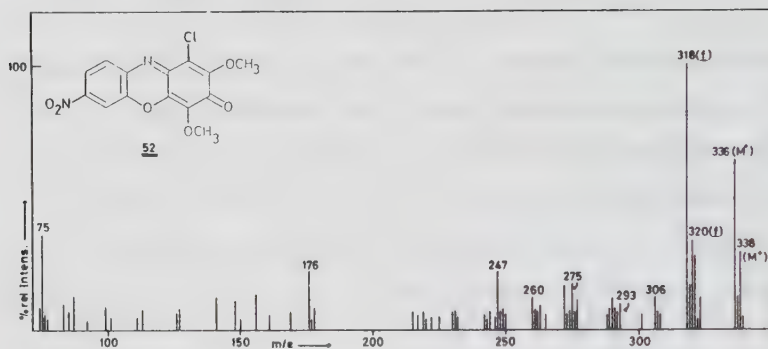


Abb.54: MS von 1-Chlor-2,4-dimethoxy-7-nitrophenoxazon (52)

Wirkungen ein: Das Fragment f bleibt base peak und die relative Intensität des Moleküliions ist noch geringer als in den Spektren der o.g. Verbindungen.

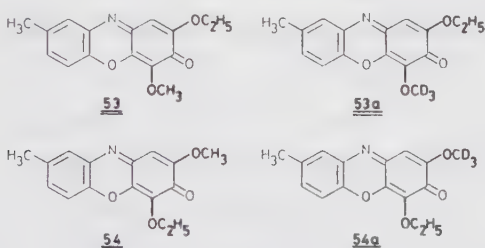
2.5.2.5. Fazit von Kap.2.5.2.4.

1. Elektronenziehende Substituenten in den Positionen 1,7 und 8 von 2,4-Dimethoxyphenoxazonen führen zur Destabilisierung des Moleküliions und zu einer deutlichen Erhöhung der relativen Intensität des charakteristischen Fragmentes f(M-H₂O) in den Massenspektren dieser Verbindungen. Dieser Effekt ist umso stärker ausgeprägt, je mehr elektronenziehende Substituenten vorhanden sind.
2. Spezifische neue Fragmentierungsreaktionen, die von diesen Substituenten verursacht werden, haben nur eine relativ geringe Bedeutung.

2.5.2.6. MS-Zerfall von 2,4-Dialkoxyphenoxazonen: Ethoxy- anstelle von Methoxyfunktionen

Der postulierte Mechanismus für die Wasserabspaltung aus den Moleküliionen von 2,4-Dimethoxyphenoxazonen (S.67) läßt sich in der gleichen Weise auch

für andere 2,4-Dialkoxyphenoxazone formulieren. Wir wollten anhand von Beispielen überprüfen, ob das Fragment f auch in den Spektren dieser Verbindungen mit nennenswerter Intensität auftritt, um damit eine weitere Stütze für den von uns vorgeschlagenen Bildungsmechanismus zu erhalten. Allerdings muß man sich darüber im klaren sein, daß im Falle des Ablaufs zusätzlicher energetisch günstiger Konkurrenzprozesse an den neu eingeführten Strukturelementen ein Fragment $M-H_2O$ fehlen kann, ohne daß damit der vorgeschlagene Mechanismus widerlegt wäre. Wir haben in diesem Zusammenhang die Ethoxy-methoxyphenoxazone 53, 53a, 54 und 54a dargestellt und massenspektrometrisch untersucht.



2.5.2.6.1. Das Massenspektrum von 2-Ethoxy-4-methoxy-8-methylphenoxazon(53)

Abb.55 gibt das Massenspektrum von 53 sowie des isotopenmarkierten Moleküls 53a wieder. Gegenüber dem Spektrum des 2,4-Dimethoxyphenoxazons 31 fällt die gesteigerte Fragmentierungstendenz des Moleküls auf.

Das Fragment m/e 267($M-H_2O$)

Das Fragment $M-H_2O$ (m/e 267) weist zwar nach wie vor eine charakteristische Intensität auf, ist jedoch nicht mehr (wie in 31) zweitstärkstes Ion im Spektrum. Der von uns vorgeschlagene Bildungsmechanismus (5.67) führt im

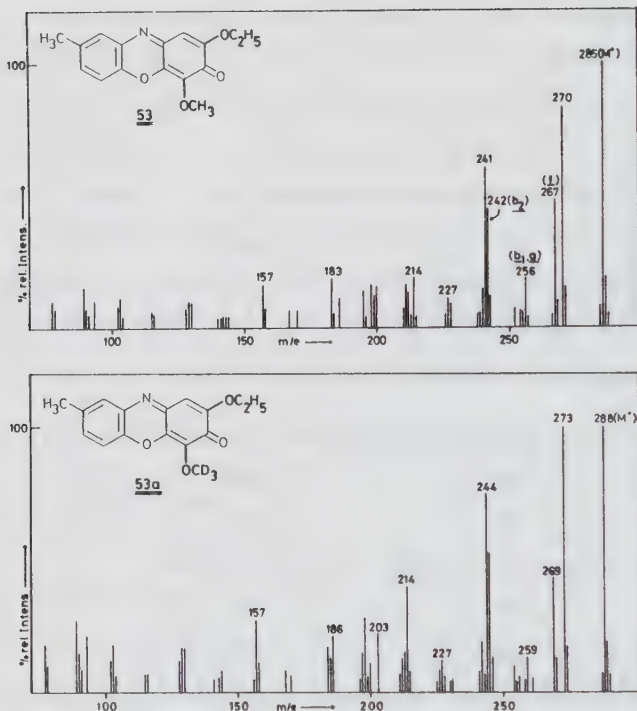


Abb.55: Massenspektren von

a) 2-Ethoxy-4-methoxy-8-methylphenoxazon(53)

b) 2-Ethoxy-4-[D₃]methoxy-8-methylphenoxazon(53a)

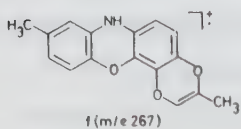


Abb.56(links): Strukturvorschlag für das Fragment m/e 267(M-H₂O) im MS von 53.

vorliegenden Falle zur Formulierung der in Abb.56 wiedergegebenen Struktur.

Dem Mechanismus entspricht die Verschiebung des Fragmentes nach m/e 269

im Spektrum von 53a.

Das Fragment m/e 270 (M-CH₃)

Dieses Ion entsteht praktisch ausschließlich durch Abspaltung eines Methylradikals aus der Ethoxygruppe an C-2, wie die Verschiebung nach m/e 273 in 53a beweist (Abb.57). Es entspricht formal dem Ion bei M-IME im Spektrum

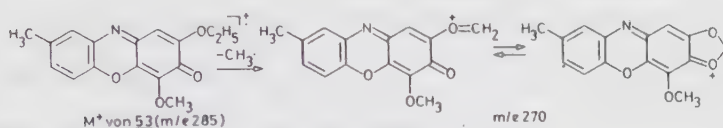


Abb.57: Bildung und Strukturvorschlag für das Fragment M-CH₃ (m/e 270) im MS von 53.

von 31 (S.57). Wegen des geringeren Energieaufwandes, der zur Spaltung einer C-C-Bindung gegenüber einer C-H-Bindung erforderlich ist, führt die Abspaltung eines Methylradikals aus der Ethoxygruppe erwartungsgemäß zu einer wesentlich günstigeren Energiebilanz als die Eliminierung eines Wasserstoffradikals aus der entsprechenden Methoxygruppe, so daß das recht stabile fragment m/e 270 mit deutlich höherer Intensität im Spektrum von 53 auftritt.

Das Fragment m/e 256

Die hochaufgelöste Messung ergibt für m/e 256 ein Dublett mit dem Intensitätsverhältnis 70:30. Während der überwiegende Teil der Abspaltung eines Ethylradikals aus dem Moleküllion entspricht, kommt der kleinere Anteil durch Eliminierung von CHO zustande. Beide Prozesse lassen sich unter Verwendung bereits früher vorgeschlagener Grundstrukturen für die entstehenden Ionen formulieren (Abb.58).

Das Fragment m/e 242

Dieses Fragment wird im Spektrum von 53a nach m/e 245 verschoben, enthält

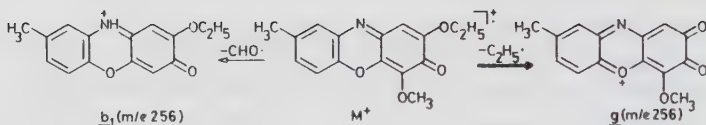
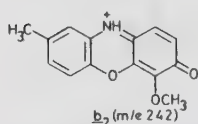


Abb.58: Zusammensetzung des Fragmentes m/e 256 im MS von 53 aus den Strukturen b₁ und g (Vorschlag).

also noch die Methoxygruppe an C-4. Da die Genese nicht durch metastabile

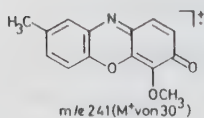


Signale gesichert ist, kann nicht entschieden werden, ob es durch CO-Abspaltung aus m/e 270 oder durch Eliminierung eines COCH_3 -Radikals direkt aus dem Molek $\ddot{u}$ lion hervorgeht.

Wir sehen diesen Fragmentierungsprozeß in Analogie zur Abspaltung eines CHO-Radikals aus der Methoxyfunktion von 2-Methoxyphenoxazonen (vgl.S.49) als - allerdings ebenfalls ungewöhnlichen - Verlust eines COCH_3 -Radikals aus der Ethoxygruppe an C-2 von 53 unter Bildung des Fragmentes b₂.

Das Fragment m/e 241

Dieses Ion entsteht formal durch Abspaltung von Acetaldehyd aus dem Molek $\ddot{u}$ lion von 53. Damit kommt man für das Fragment zur Struktur des Molek $\ddot{u}$ l-



ions von 30.

Die Abspaltung von Acetaldehyd ist als MS-Zerfallsreaktion von Aryl-ethylethern literaturbekannt¹⁰⁴⁾

und stellt das Analogon zur Eliminierung von Form-⁸⁷⁻⁹⁰⁾aldehyd aus den entsprechenden Methylethern dar.

Die wichtigsten Fragmentierungsprozesse im Spektrum von 53 sind in Abb.59 noch einmal zusammengefaßt:

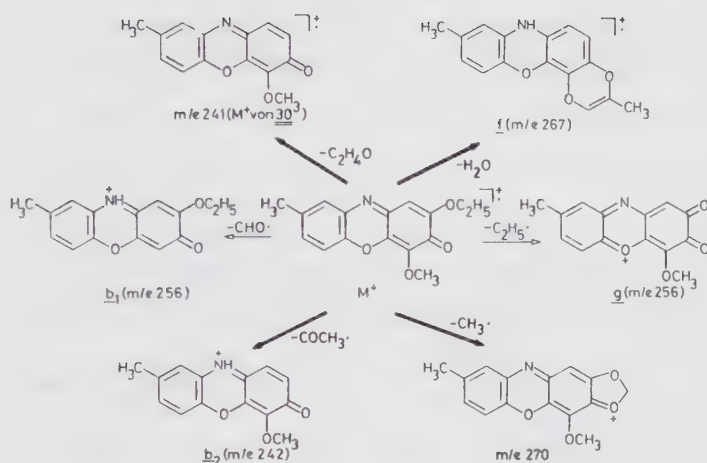


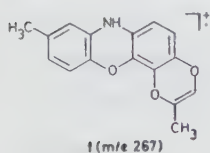
Abb.59: Fragmentierungsschema für den MS-Zerfall von 53

2.5.2.6.2. Das Massenspektrum von 4-Ethoxy-2-methoxy-8-methylphenoxazon(54)

Abb.60 zeigt die Massenspektren von 54 und 54a. Man erkennt eine sehr ausgeprägte Fragmentierungstendenz des Molekülions sowie signifikante Unterschiede zum Spektrum von 53, die sich insbesondere in einer Bildung der intensiven Ionen m/e 228 und m/e 211/212 äußern. Die wichtigsten Fragmente werden im folgenden diskutiert.

Das Fragment m/e 267 ($M-H_2O$)

Da offenbar bevorzugt Konkurrenzprozesse ablaufen, ist im Gegensatz zu 53 die Intensität des Fragmentes $M-H_2O$ gering und daher wenig charakteristisch.



Das Fragment erfährt in 54a die erwartete Verschiebung nach m/e 269. Das Ion m/e 270 im MS von 54a kommt durch Eliminierung eines CD_3 -Radikals (s.u.) zustande (Hochauflösung, Singulett).

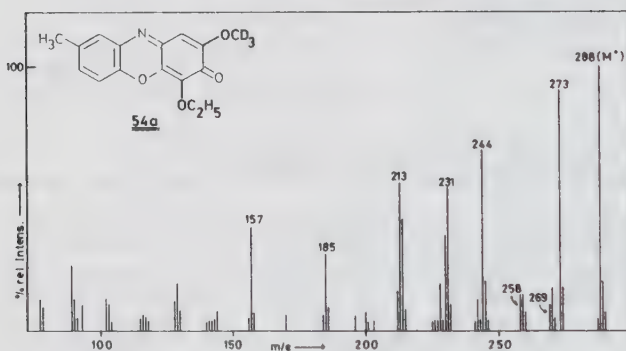
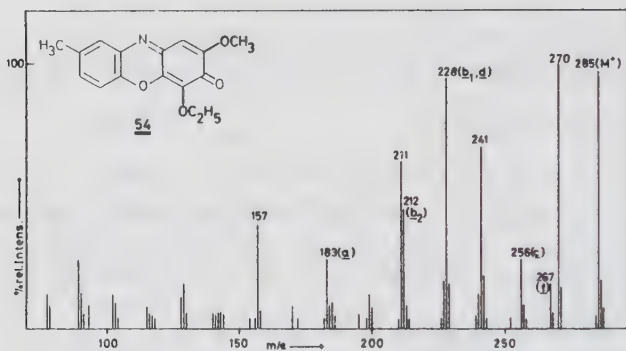


Abb.60: Massenspektren von

- a) 4-Ethoxy-2-methoxy-8-methylphenoxazon (54)
- b) 4-Ethoxy-2-[D₃]methoxy-8-methylphenoxazon (54a)

Das Fragment m/e 270 (M-CH₃)

Die Struktur dieses Fragmentes ist nicht einheitlich. Der weit überwiegende Anteil entsteht allerdings – wie beim Zerfall von 53 – durch Abspaltung eines Methylradikals aus der Ethoxyfunktion (Verschiebung nach m/e 273 im Spektrum von 54a). Durch Abspaltung eines Methylradikals aus der Methoxygruppe an C-2 erfolgt daneben in sehr geringem Ausmaß die Bildung des Ions mit der Struktur g (Abb.61). Dieser Fragmentierungsprozeß ist an der unveränderten Lage

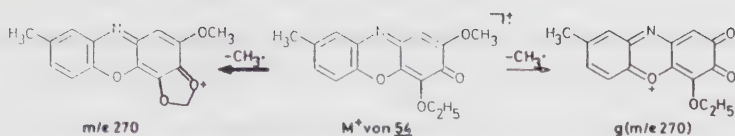


Abb.61: Strukturelle Zusammensetzung des Fragmentes m/e 270
im MS von 54 (Vorschlag)

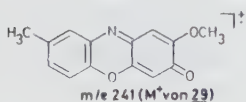
von m/e 270 im Spektrum von 54a zu erkennen (Abspaltung von CD_3 , hochaufgelöste Messung, s.o.).

Das Fragment m/e 256

Die hochaufgelöste Messung ergibt in diesem Falle ein Singulett entsprechend der Abspaltung von C_2H_5 aus dem Molekülion. Trotzdem ist die Struktur dieses Ions offenbar nicht einheitlich, denn das Spektrum von 54a weist die Fragmente m/e 258 und m/e 259 in etwa gleicher Intensität auf: während m/e 259 alle drei Deuteriumatome enthält (Fragment c), ist m/e 258 nur dideuteriert. Diesem Umstand läßt sich durch die Formulierung eines Zweistufenmechanismus Rechnung tragen (Abb.62), indem unter Erzeugung des Ions m/e 257 (m/e 260 in 54a) zunächst Äthylen abgespalten wird, gefolgt von der Eliminierung eines Wasserstoffradikals aus der Methoxygruppe an C-2. Die Abspaltung von Äthylen wird häufig aus aromatischen Ethylethern beobachtet^{104,105}).

Das Fragment m/e 241

Die Entstehung dieses Fragmentes sehen wir in Analogie zum Spektrum von 53:



Die Formulierung eines Acetaldehyd-Verlustes aus der Ethoxyfunktion¹⁰⁴) führt im vorliegenden Falle zur Struktur des Molekülions von 29.

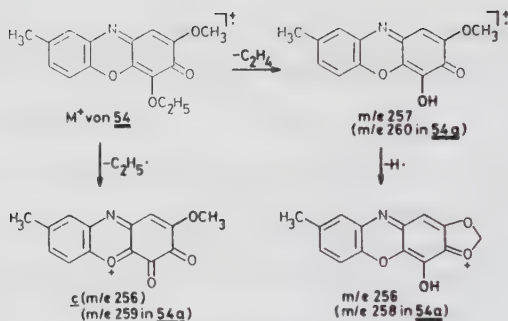


Abb.62: Genese von m/e 256 im MS von 54 und Vorschlag zur strukturellen Zusammensetzung dieses Fragmentes

Das Fragment m/e 228

Die Struktur dieses sehr intensiven und für 54 offensichtlich charakteristischen Fragmentes ist nicht einheitlich, obwohl man durch hochaufgelöste Messung ein Singulett ermittelt: Im Spektrum von 54a findet eine Aufspaltung in zwei Ionen mit unterschiedlichen Deuterium-Gehalten statt (m/e 230 und m/e 231; das Fragment m/e 228 in 54a entsteht durch Verschiebung von m/e 227 in 54). Das Zerfallsschema in Abb.63 erklärt diesen Befund. Während

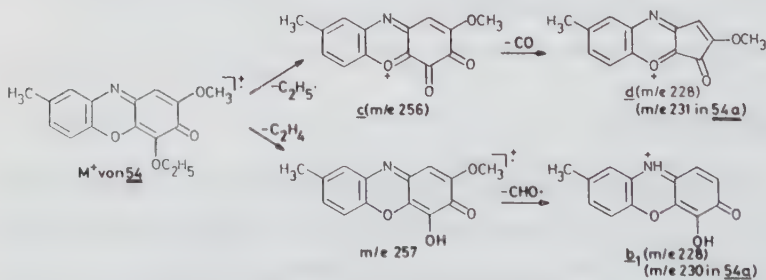


Abb.63: Bildung von m/e 228 im MS von 54 und Vorschlag zur strukturellen Zusammensetzung dieses Fragmentes

der über das Fragment c verlaufende Fragmentierungsweg in Analogie zum 2,4-Dimethoxyphenoxazon 31 (S.72) zu sehen ist, diskutieren wir in einem zweiten Fragmentierungsprozeß unter Abspaltung von CHO aus m/e 257 die Bildung des Ions b₁: Die Überlagerung beider Genesen machen wir für die hohe Intensität von m/e 228 mit verantwortlich.

Die Fragmente m/e 211 und m/e 212

Diese beiden Fragmente erfahren im Spektrum von 54a eine Verschiebung um jeweils 2ME nach m/e 213/214. Die Verschiebung von m/e 212 nach m/e 214 entspricht der Erwartung für die Eliminierung eines CHO-Radikals aus der Methoxygruppe von m/e 241 im MS von 54 (Struktur des Molekülions von 29!, vgl.S.89 u.49).

Das Ion m/e 211 kommt jedoch offenbar nur in untergeordnetem Maße durch Abspaltung von Formaldehyd aus m/e 241 zustande, wie die geringe Intensität des Fragmentes m/e 212 im Spektrum von 54a beweist (Abspaltung von CD₂O aus m/e 244). Für die Entstehung des weit überwiegenden Anteils von m/e 211 im MS von 54 (Verschiebung nach m/e 213 in 54a) diskutieren wir die Abspaltung eines Moleküls Ameisensäure aus dem - im Spektrum von 54 relativ schwachen - Ion m/e 257 unter Beteiligung der Methoxygruppe an C-2 und der Hydroxygruppe an C-4 dieses Fragmentes. Auf diesen Prozeß, auf den im Augenblick nicht näher eingegangen werden soll, kommen wir im Zusammenhang mit der Analyse des Massenspektrums von 4-Hydroxy-2-methoxy-8-methylphenoxazon(62, M⁺=m/e 257) im Detail zurück (S.102).

Im Fragmentierungsschema in Abb.64 sind alle wichtigen Zerfallsreaktionen von 54 noch einmal zusammengestellt.

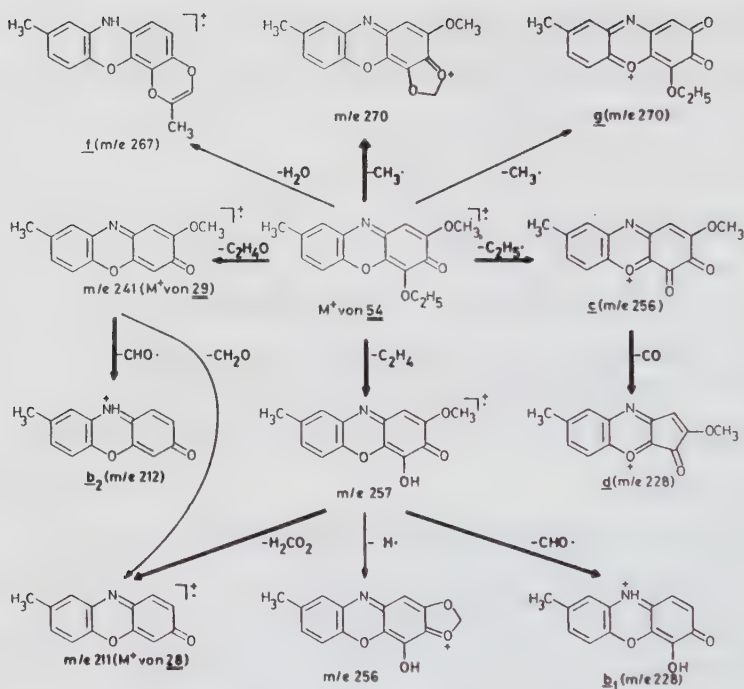


Abb.64: Fragmentierungsschema für den MS-Zerfall von 54

2.5.2.7. Fazit von Kap. 2.5.2.6.

- Das Fragment $f(M-H_2O)$ wird auch in den Spektren des 2-Ethoxy-4-methoxyphenoxazons 53 und des 4-Ethoxy-2-methoxyphenoxazons 54 beobachtet. Der von uns vorgeschlagene Fragmentierungsmechanismus für die Bildung dieses Ions (S.67) in den Spektren der 2,4-Dimethoxyphenoxazone ist auch auf 53 und 54 übertragbar; die Entstehung des Fragmentes f entspricht daher der Erwartung. Im Gegensatz zu den Spektren der 2,4-Dimethoxyphenoxazone ist die Wasserabspaltung aus den Molekülionen von 53 und 54 jedoch nicht

mehr der Hauptfragmentierungsprozeß und verliert insbesondere beim Ersatz der Methoxygruppe an C-4 durch eine Ethoxyfunktion (54) erheblich an Bedeutung.

2. Die deutlich ausgeprägtere Fragmentierungstendenz der Molekülionen von 53 und 54 gegenüber denjenigen der 2,4-Dimethoxyphenoxazone geht im wesentlichen auf Eliminierungsreaktionen aus der jeweiligen Ethoxygruppe zurück, wie anhand der Spektren der isotopenmarkierten Verbindungen 53a und 54a bewiesen werden konnte.
3. Durch die intensiven Fragmente m/e 211 und m/e 228 im Spektrum von 54 können beide Verbindungen (53 und 54) massenspektrometrisch leicht unterschieden werden.

2.5.3. Erweiterung der Untersuchung von Substituenteneinflüssen auf die elektronenstoßinduzierte Fragmentierung von Phenoxazonen

Im Zuge der Untersuchung des bemerkenswerten Wasserabspaltungsprozesses aus den Molekülonen von 2,4-Dimethoxyphenoxazonen haben wir bereits die Massenspektren einer Reihe von Phenoxazonen diskutiert, die im Ring C einfach oder zweifach methoxy- bzw. ethoxysubstituiert sind. Dabei beobachteten wir - neben der Bildung des Ions $f(M-H_2O)$ - das Auftreten weiterer spezifischer Fragmente, die sich als charakteristisch für bestimmte Substitutionsmuster im Ring C erwiesen.

Um einen verfeinerten Einblick in die strukturanalytische Anwendbarkeit der Massenspektrometrie bei unterschiedlich substituierten Phenoxazonen zu gewinnen, soll daher im folgenden - unabhängig vom Vorliegen eines Fragmentes $M-H_2O$ - generell untersucht werden, wie sich die Spektren der Phenoxazone ändern, wenn man ausgehend von einfach substituierten Verbindungen sukzessive weitere Substituenten in verschiedene Positionen einführt und damit die untersuchte Verbindung, stufenweise komplizierter macht. Es ging uns dabei insbesondere um eine Vervollständigung der MS-Analyse von Phenoxazonen, die im Ring C methoxy- bzw. hydroxysubstituiert sind, um die bisher bereits erarbeiteten Ergebnisse in ein Gesamtbild integrieren zu können.

2.5.3.1. Das Massenspektrum von 4,8-Dimethylphenoxazon(55)

Der MS-Zerfall von unsubstituiertem Phenoxazon(7) und 8-Methylphenoxazon(28) hatte sich in bezug auf die Hauptfragmentierungsreaktion (Abspaltung von CO aus dem Molekülon) als identisch erwiesen (vgl.S.43). Im Gegensatz dazu bewirkt die Einführung einer Methylgruppe in Position 4 am Ring C eine Veränderung des Fragmentierungsverhaltens gegenüber 7 und 28. Wie Abb.65 zeigt, treten im Spektrum von 55 nebeneinander und mit gleicher Intensität die

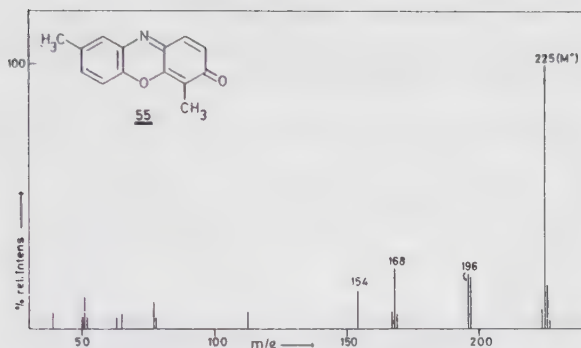


Abb. 65: Massenspektrum von 4,8-Dimethylphenoxazon (55)

Fragmente M-CO und M-CHO auf (m/e 197 und m/e 196). Es liegt nahe, daß am letztgenannten Prozeß ein Wasserstoffatom der neu hinzugekommenen Methylgruppe an C-4 beteiligt ist. Durch Formulierung einer Ringerweiterungsreaktion kommt man zu dem in Abb. 66 wiedergegebenen plausiblen Strukturvorschlag für m/e 196:

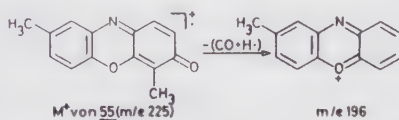


Abb. 66: Strukturvorschlag für das Fragment m/e 196 im MS von 55

Eine vergleichbare Ringerweiterungsreaktion unter Bildung eines voll konjugierten Sulfoniumions beobachtet man in den Spektren von Methylthiophenen¹⁰⁶⁾.

2.5.3.2. Die Massenspektren von Hydroxyphenoxazonen

2.5.3.2.1. Die Massenspektren von 2-Hydroxy-8-methylphenoxazon(56) und 2,4-Dihydroxy-8-methylphenoxazon(57)

Abb.67 gibt die Massenspektren der Hydroxyphenoxazone 56 und 57 wieder:

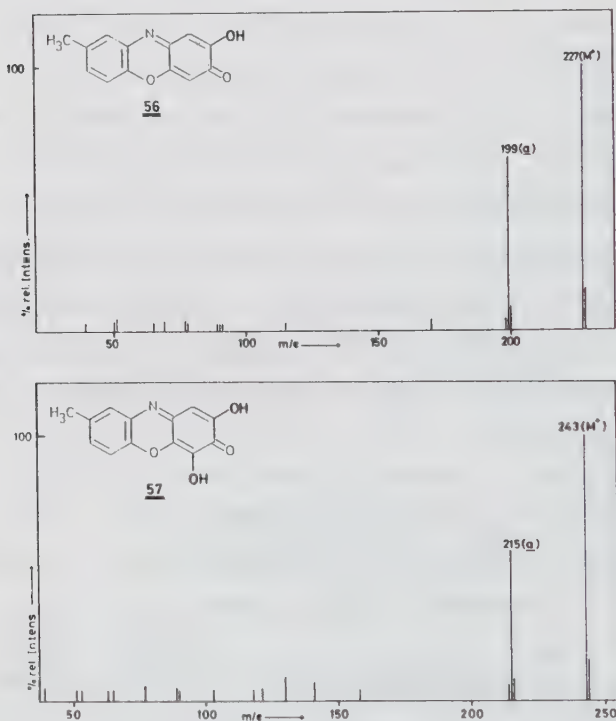


Abb.67: Massenspektren von 2-Hydroxy-8-methylphenoxazon(56) und 2,4-Dihydroxy-8-methylphenoxazon(57)

Man kommt zu dem Befund, daß der Charakter des Spektrums des 8-Methylphenoxazons(28) in 56 und 57 voll erhalten bleibt: Außer der bereits bekannten CO-Eliminierung aus dem Molekölion treten keine neuen Fragmente auf.

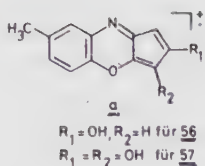


Abb.68: Strukturvorschlag für die Fragmente m/e 199 und m/e 215 in den Massenspektren von 56 und 57

In Analogie zu 28 formulieren wir den Strukturvorschlag a (Abb.68) für das Fragment M-CO.

2.5.3.2.2. Die Massenspektren von 4,8-Dimethyl-2-hydroxyphenoxazon(58) und 4-Ethyl-2-hydroxy-8-methylphenoxazon(59)

Da sich gezeigt hatte, daß die Einführung von Hydroxygruppen in die Positionen 2 und 4 am Ring C keine Veränderung des Fragmentierungsverhaltens bewirkt (56 und 57 gegenüber 28), war zu erwarten, daß auch der MS-Zerfall von 58 mit demjenigen von 4,8-Dimethylphenoxazon(55) weitgehend identisch ist. Das Massenspektrum von 58 (Abb.68) bestätigt diese Erwartung.

Eine deutliche Veränderung des Fragmentierungsverhaltens tritt ein, wenn man von der 4-Methyl- zur 4-Ethylverbindung (59) übergeht (Abb.68): Durch bevorzugte Abspaltung eines Methylradikals entsteht das Ion m/e 240, aus dem durch CO-Eliminierung das Fragment m/e 212 hervorgeht. Die unter Ringerweiterung verlaufende Bildung eines stabilen Oxoniumions (Abb.69) sehen wir als Grund für die hohe Stabilität von m/e 240 an:

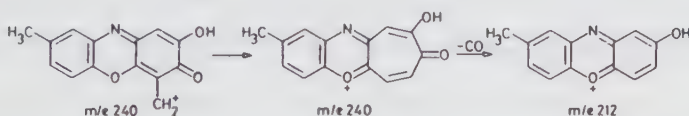


Abb.69: Strukturvorschläge für die Ionen m/e 240 und m/e 212 im Massenspektrum von 59

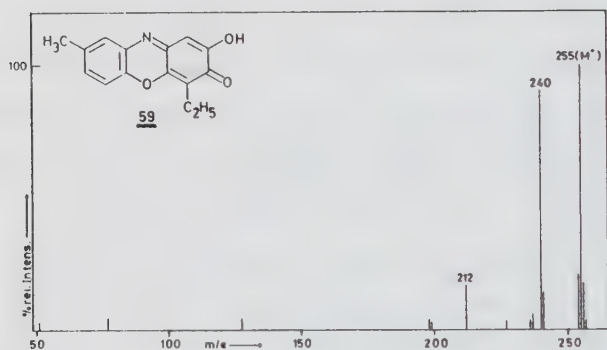
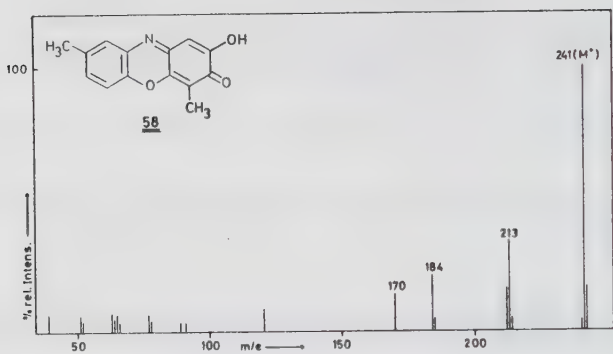


Abb.68: Massenspektren von

a) 4,8-Dimethyl-2-hydroxyphenoxazon(58) und

b) 4-Ethyl-2-hydroxy-8-methylphenoxazon(59)

Auffallend im Spektrum von 59 ist auch die gegenüber 58 erhöhte Intensität des Fragmentes M-H. Abb.70 gibt unseren Strukturvorschlag für dieses Ion wieder:

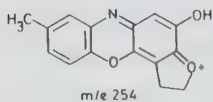


Abb.70: Strukturvorschlag für das Ion m/e 254 (M-H) im MS von 59

2.5.3.3. Fazit von Kap. 2.5.3.2.

1. Hydroxyfunktionen an C-2 und C-4 im Ring C von Phenoxazonen bewirken keine Veränderung im massenspektrometrischen Fragmentierungsverhalten gegenüber der im Ring C unsubstituierten Verbindung.
2. Ebenfalls unbeeinflusst bleibt der MS-Zerfall des 4,8-Dimethylphenoxazons (55) durch Einführung einer Hydroxygruppe in Position 2 (58).
3. Alkylfunktionen an C-4 bewirken eine deutliche Veränderung des Fragmentierungsverhaltens gegenüber den entsprechenden an C-4 unsubstituierten Phenoxazonen.

2.5.3.4. Die Massenspektren von 4,8-Dimethyl-2-methoxyphenoxazon(60) und 4-Ethyl-2-methoxy-8-methylphenoxazon(61)

Da sich gezeigt hatte, daß eine zusätzliche Alkylgruppe an C-4 deutliche Auswirkungen auf das Fragmentierungsverhalten von 2-Hydroxyphenoxazonen hat, war die Beantwortung der Frage von Interesse, ob entsprechende Beobachtungen auch bei 2-Methoxyphenoxazonen zu machen sein würden. Aus diesem Grunde haben wir die 4-Alkyl-2-methoxyphenoxazone 60 und 61 dargestellt, deren Massenspektren zusammen mit demjenigen der isotopenmarkierten Verbindung 61a in Abb.71 wiedergegeben sind.

Offensichtlich bleibt der Hauptfragmentierungsprozeß des 2-Methoxy-8-methylphenoxazons(29) - die Abspaltung eines CHO-Radikals aus der Methoxyfunktion - auch in den Spektren der 4-Alkyl-2-methoxyphenoxazone dominant. Dies beweist die Lage des Fragmentes b bei m/e 242 im Spektrum von 61a (Abspaltung von CDO aus dem Molekülion, hochaufgelöste Messung).

Während das Spektrum von 60 gegenüber demjenigen von 29 (S.43) unverändert ist, weist das Spektrum von 61 drei zusätzliche charakteristische Fragmente auf, und zwar die Ionen $M-CH_3$, $M-H_2O$ und $M-(H_2O+H)$. Das Fragment $M-CH_3$ (m/e 254)

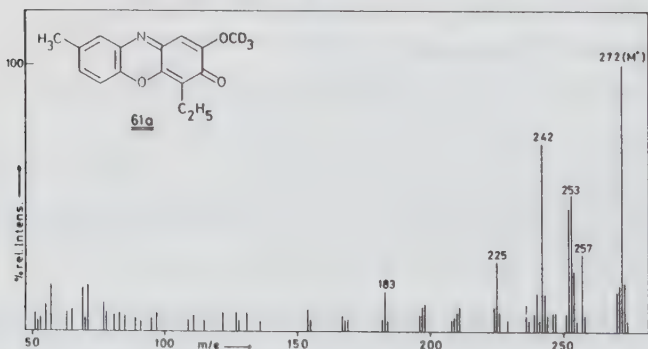
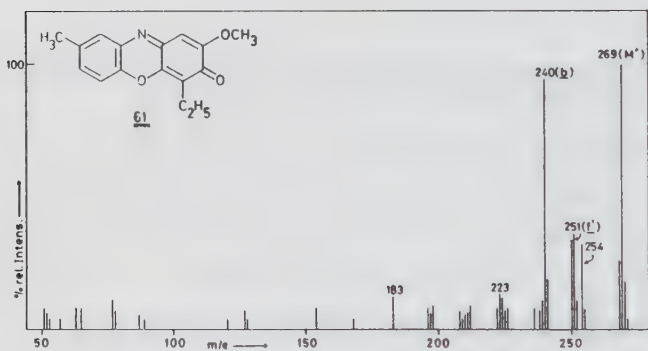
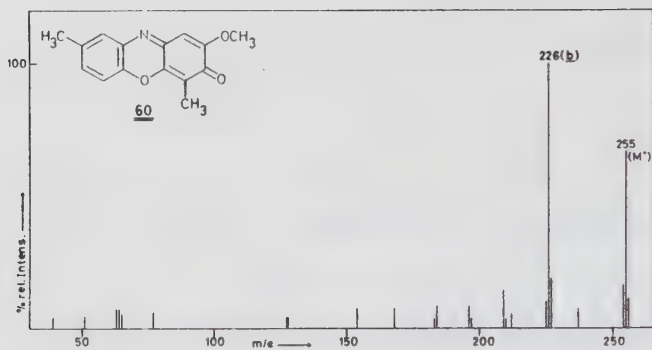


Abb. 71: Massenspektren von a) 4,8-Dimethyl-2-methoxyphenoxazon (60)
 b) 4-Ethyl-2-methoxy-8-methylphenoxazon (61) und
 c) 4-Ethyl-2-[D₃]methoxy-8-methylphenoxazon (61a)

entsteht durch Abspaltung eines Methylradikals aus der Ethylgruppe an C-4, wie die Verschiebung dieses Ions nach m/e 257 im Spektrum von 61a beweist. Die gleiche Zerfallsreaktion hatte im Spektrum von 59 zur Bildung des zweitstärksten Ions geführt (m/e 240).

In der überraschenden Bildung des Fragmentes $M-H_2O$ im Spektrum von 61 sehen wir eine interessante Analogie zur Wasserabspaltung aus den Molekülonen von 2,4-Dimethoxyphenoxazonen unter Bildung des Ions f: Überträgt man den von uns für diese Verbindungen vorgeschlagenen Fragmentierungsmechanismus (S.67) auf 61, läßt sich die Struktur f' (Abb.72) für das Fragment $M-H_2O$ formulieren:

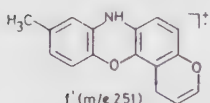


Abb.72: Strukturvorschlag für das Fragment $M-H_2O$ (m/e 251) im MS von 61

Die Struktur f' unterscheidet sich demnach von f durch den Ersatz des Sauerstoffatoms an C-4 durch eine Methylengruppe. Auch die Tatsache, daß die Methoxygruppe an C-2 von 61 nur eines der Wasserstoffatome liefert, die in das eliminierte Wassermolekül eingebaut werden (im Spektrum von 61a tritt das Fragment um 2ME verschoben bei m/e 253 auf), ist mit dem vorgeschlagenen Mechanismus in Übereinstimmung.

Bemerkenswert ist auch die Bildung des Fragmentes $M-(H_2O+H)$ (m/e 250). Die Genese dieses Ions läßt sich durch Abspaltung eines Wasserstoffradikals aus der Methylengruppe von f' gut realisieren (Abb.73). Dieser Prozeß kann ausgehend von der Struktur f nicht formuliert werden. Damit bietet sich eine Erklärung für die Abwesenheit eines solchen Fragmentes in den Spektren der 2,4-Dimethoxyphenoxazone an.

Die wichtigsten Zerfallsprozesse im MS von 61 sind in Abb.73 zusammengefaßt:

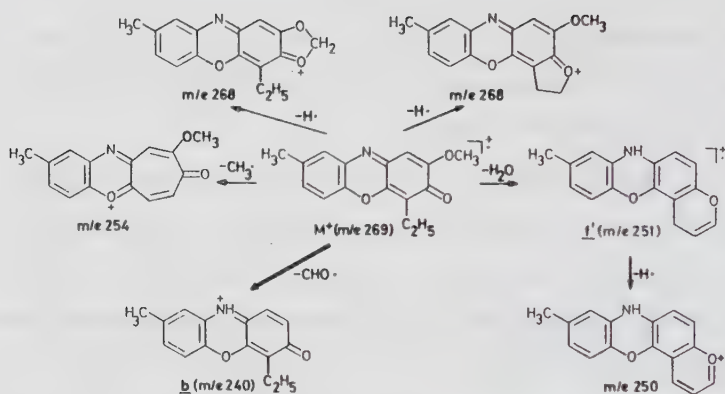


Abb.73: Fragmentierungsschema für den MS-Zerfall von 61

2.5.3.5. Fazit von Kap.2.5.3.4.

1. Durch eine zusätzliche Alkylgruppe an C-4 ändert sich das Fragmentierungsverhalten von 2-Methoxyphenoxazonen in deutlich geringerem Umfang als bei solchen Phenoxazonen, die an C-2 eine Hydroxyfunktion tragen bzw. unsubstituiert sind. Der Hauptfragmentierungsprozeß ist auch in den Spektren der untersuchten 4-Alkyl-2-methoxyphenoxazone die Abspaltung eines $CHO^\bullet$ -Radikals aus der Methoxygruppe.
2. Eine Ethylgruppe an C-4 führt zur Bildung charakteristischer Fragmente $M-H_2O$ und $M-(H_2O+H)$, deren Entstehung in Analogie zur Wasserabspaltung aus den Molekülonen von 2,4-Dimethoxyphenoxazonen zu sehen ist.

2.5.3.6. Das Massenspektrum von 4-Hydroxy-2-methoxy-8-methylphenoxazon (62)

Das Fragmentierungsverhalten von Phenoxazonen, die im Ring C unsubstituiert sind oder eine Alkylfunktion an C-4 tragen, wird nach unseren Befunden durch

das Einführen zusätzlicher Hydroxygruppen in die Positionen 2 und 4 nicht verändert. Wir erwarteten daher auch nur geringe Änderungen im MS-Zerfall beim Übergang von einem 2-Methoxyphenoxazon auf ein 4-Hydroxy-2-methoxyphenoxazon, da hier ebenfalls lediglich eine vermeintlich "unwirksame" Hydroxyfunktion zusätzlich in den Ring C eingeführt wurde. Abb.74 zeigt die Massenspektren von 62 sowie der isotopenmarkierten Verbindung 62a:

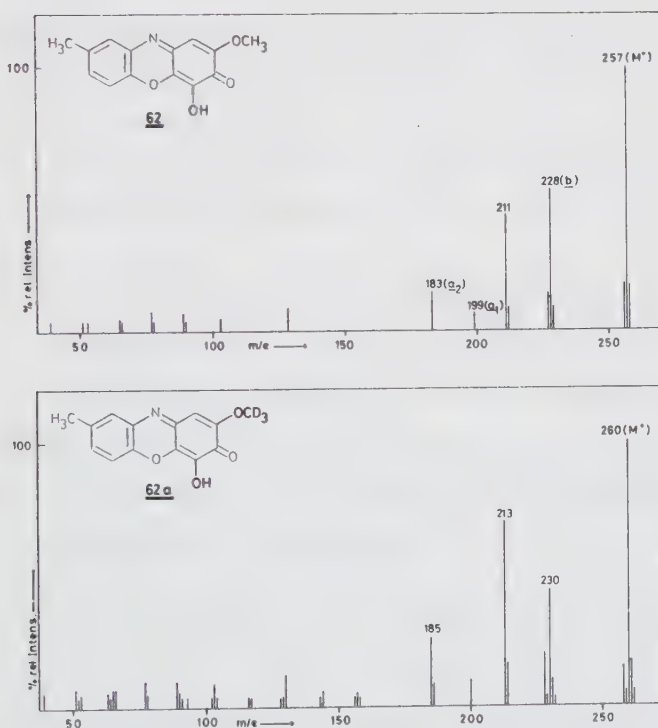


Abb.74: Massenspektren von

- a) 4-Hydroxy-2-methoxy-8-methylphenoxazon(62) und
 b) 4-Hydroxy-2-[D₃]methoxy-8-methylphenoxazon(62a)

Wie man sofort erkennt, wird die Erwartung in diesem Falle widerlegt: Neben dem erwarteten Fragment $\underline{b}$ (m/e 228) tritt im Spektrum von $\underline{62}$ ein Ion m/e 211 mit etwa gleicher Intensität auf. Einen derartigen formalen Verlust von 46ME aus dem Molekülion hatten wir zwar bereits im Spektrum des 2-Methoxyphenoxazons $\underline{29}$ beobachtet (m/e 195, vgl.S.43), wobei das Fragment jedoch dort von untergeordneter Intensität war. Wichtig ist aber der Befund, daß der zugrundeliegende Fragmentierungsmechanismus beim Zerfall von $\underline{62}$ ein anderer sein muß, denn die Herkunft der Atome, die in die eliminierte Elementkombination eingebaut werden, unterscheidet sich von der Fragmentierung des Phenoxazons $\underline{29}$. Dies geht aus dem Spektrum von $\underline{62a}$ hervor: nur ein Wasserstoffatom der Methoxygruppe an C-2 ist an der Abspaltung beteiligt (m/e 213), während es im Falle der Verbindung $\underline{29}$ zwei waren (m/e 196 in $\underline{29d}$, vgl.S.44). Weiterhin fehlt bei hoher Intensität von m/e 211 im Spektrum von $\underline{62}$ ein Fragment $M-H_2O$ völlig, so daß uns fraglich erscheint, ob das Fragment bei M-46ME auch hier in einem zweistufigen Prozeß aus dem Molekülion gebildet wird (vgl.S.54).

Die Befunde sind dagegen erklärbar, wenn man eine einstufige Eliminierung von Ameisensäure (46ME) aus dem Molekülion unter Beteiligung der OH-Gruppe an C-4 formuliert (Abb.75). Der Eliminierung muß eine Umlagerung im Molekülion vorausgehen, die wir in Analogie zu $\underline{29}$ sehen (vgl.S.49). OH-Wanderungen an Carbonylkohlenstoffatome sind im Zuge massenspektrometrischer Fragmentierungsprozesse literaturbekannt¹⁰⁷⁾.

Unser Strukturvorschlag für das Fragment m/e 211 ist identisch mit der Struktur des Molekülions von 8-Methylphenoxazon($\underline{28}$). Mit diesem Postulat steht das Auftreten des Folgeions $\underline{a_2}$ (m/e 183) im Einklang (CO-Abspaltung, vgl.S.43).

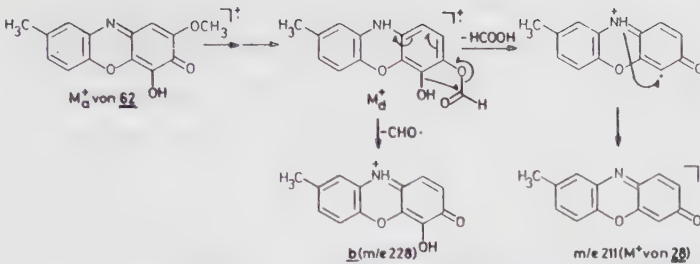


Abb.75: Entstehung der Fragmente m/e 228 und m/e 211 im MS von 62:
Fragmentierungsmechanismen und Ionenstrukturen (Vorschläge)

Die restlichen Fragmente im Spektrum von 62 kommen aufgrund bereits bekannter Zerfallsprozesse zustande. Das Fragmentierungsschema in Abb.76 faßt die wichtigsten Reaktionen zusammen:

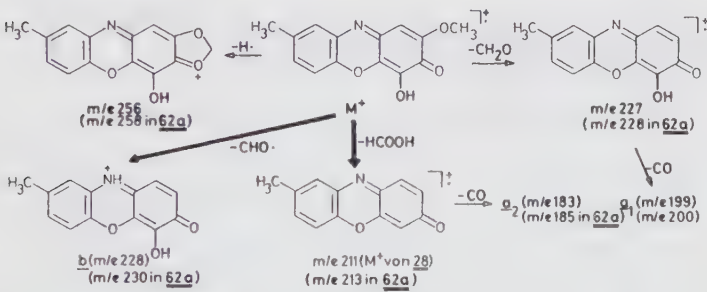


Abb.76: Fragmentierungsschema für den MS-Zerfall von 62

2.5.3.7. Fazit von Kap. 2.5.3.6.

- Das Fragmentierungsverhalten des 4-Hydroxy-2-methoxyphenoxazons 62 unterscheidet sich in charakteristischer Weise von demjenigen des 2-Methoxyphenoxazons 29 durch die Bildung eines intensiven Fragmentes bei $M-46ME (M-H_2CO_2)$.

2. Es läßt sich zeigen, daß diese Zerfallsreaktion nicht mit dem Zweistufenprozeß verwandt ist, der zur Bildung des sehr schwachen Ions bei M-46ME im Spektrum von 29 führt. Wir diskutieren den Einbau der in Abb.77 gekennzeichneten Atome in die jeweils abgespaltene Elementkombination.

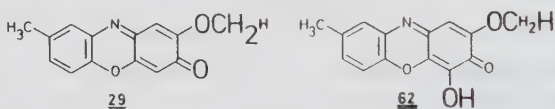


Abb.77: Genese des Fragmentes bei M-46 ME(M-H₂CO₂): Kennzeichnung der Atome von 29 und 62, die jeweils in die eliminierte Elementkombination eingebaut werden (für 29: exakt bewiesen, für 62: Vorschlag)

2.5.3.8. Die Massenspektren von 2-Chlor-4-methoxy-8-methylphenoxazon(63), 1,2-Dichlor-4-methoxy-8-methylphenoxazon(64) und 2,7-Dichlor-4-methoxy-8-methylphenoxazon(65)

In Analogie zur massenspektrometrischen Untersuchung des 1-Chlor-2,4-dimethoxyphenoxazons 51 (S.81) haben wir den Einfluß zusätzlicher Chloratome auf das Fragmentierungsverhalten des 4-Methoxyphenoxazons 30 geprüft.

Abb.78 gibt die Spektren der Verbindungen 63, 64 und 65 wieder. Man erkennt, daß der Einfluß der Chlorsubstituenten sowohl im Ring A als auch im Ring C minimal bleibt (vgl.S.52) und nicht mit dem Effekt verglichen werden kann, der im Spektrum von 51 (gegenüber 31, S.57) zum Ausdruck kommt.

Im Spektrum von 63 kommen gegenüber 30 die wenig intensiven Fragmente m/e 239 (M-HCl) und m/e 210 (m/e 239-CHO) hinzu. Das Fragment m/e 210 enthält kein Chloratom mehr, wie zunächst aufgrund des vorhandenen m/e 212 angenommen werden könnte (hochaufgelöste Messung).

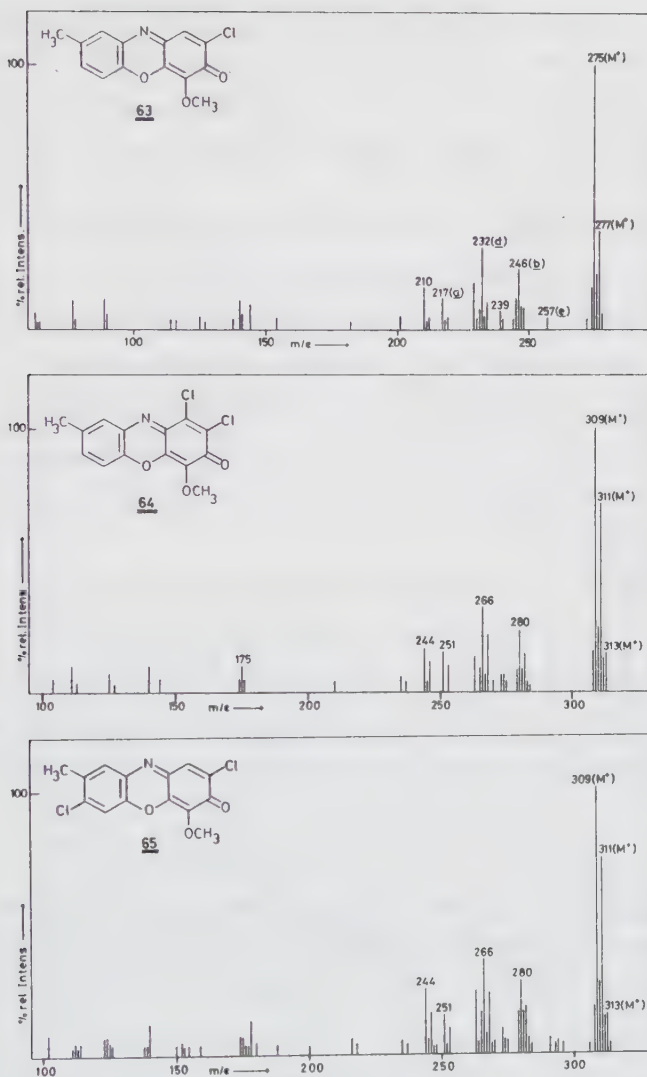


Abb. 78: Massenspektren von a) 2-Chlor-4-methoxy-8-methylphenoxazon(63),
 b) 1,2-Dichlor-4-methoxy-8-methylphenoxazon(64) und
 c) 2,7-Dichlor-4-methoxy-8-methylphenoxazon(65)

Die Spektren von 64 und 65 sind nahezu identisch. Die in 63 beobachteten Fragmente sind jeweils um die Masse eines Chloratoms zu höheren Massen verschoben. Die große Ähnlichkeit der MS-Fragmentierung schließt eine Unterscheidung dieser Isomeren mittels Massenspektrometrie aus.

2.5.3.9. Das Massenspektrum von 2-Hydroxy-4-methoxy-8-methylphenoxazon(66)

Wir hatten zeigen können, daß beim Übergang von einem 2-Methoxyphenoxazon auf ein 4-Hydroxy-2-methoxyphenoxazon eine charakteristische Veränderung des MS-Zerfalles auftritt. Um zu überprüfen, ob ein ebenso deutlicher Unterschied zwischen den Spektren von 4-Methoxyphenoxazonen und 2-Hydroxy-4-methoxyphenoxazonen besteht, haben wir die Verbindung 66 massenspektrometrisch vermessen. Abb.79 und Abb.80 zeigen die Spektren von 66 sowie der isotopenmarkierten Spezies 66a-c.

Man erkennt, daß hier offensichtlich eine direkte Parallele zu dem Effekt vorliegt, den die Einführung einer OH-Gruppe in die Position 4 eines 2-Methoxyphenoxazons auf dessen Fragmentierungsverhalten ausübt: Im Spektrum von 66 fällt die gegenüber dem MS-Zerfall des 4-Methoxyphenoxazons 30 (vgl.S.52) erheblich gesteigerte Intensität des Fragmentes bei M-46ME(m/e 211) auf.

Es erhebt sich die Frage, welcher Fragmentierungsmechanismus für die Genese von m/e 211 im MS von 66 verantwortlich ist: Kommt der zweistufige Mechanismus zum Tragen, im Zuge dessen das Ion bei M-46ME im Spektrum von 30 entsteht (Abspaltung von H_2O+CO , vgl.S.54), oder erklärt ein Einstufenmechanismus unter Eliminierung von Ameisensäure die experimentellen Befunde? Ein solcher Mechanismus läßt sich in Analogie zu unserem Vorschlag für den Zerfall des 4-Hydroxy-2-methoxyphenoxazons 62 formulieren (vgl.S.105), wenn man von einer Umlagerung des Molekülions unter Beteiligung der Methoxygruppe an C-4 ausgeht (Abb.81).

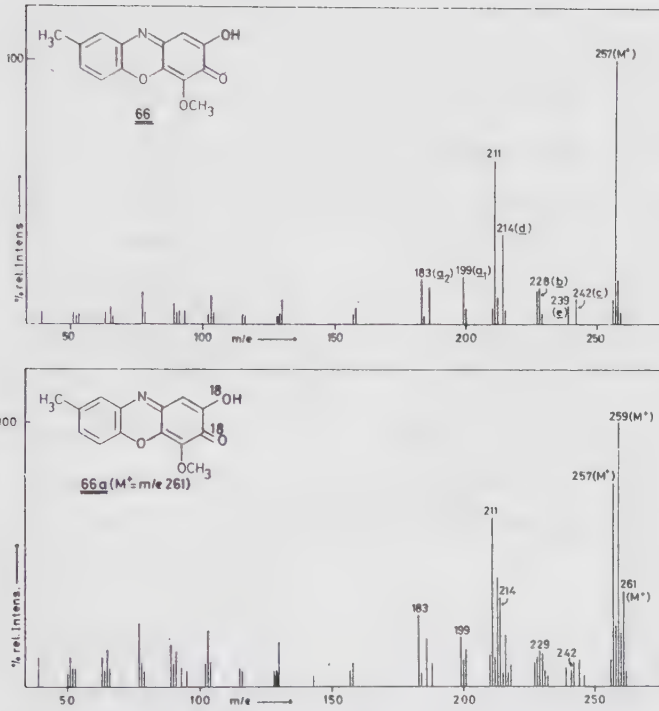


Abb.79: MS von a) 2-Hydroxy-4-methoxy-8-methylphenoxazon(66)
 b) 2-[^{18}O]Hydroxy-4-methoxy-8-methyl-[Carbonyl- ^{18}O]phenoxazon
 (66a, $M^+=m/e$ 261, 17%) neben gering markierten Spezies
 (mono- ^{18}O : m/e 259, 47% ; unmarkiert: m/e 257, 36%)

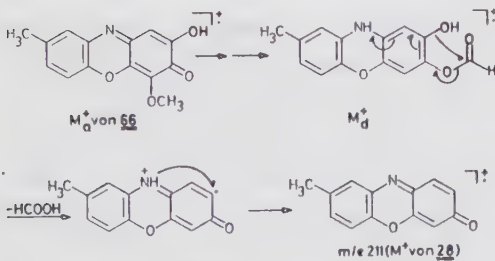


Abb.81: Entstehung des
 Fragmentes m/e 211 im MS
 von 66: Fragmentierungs-
 mechanismus und Ionen-
 struktur (Vorschlag)

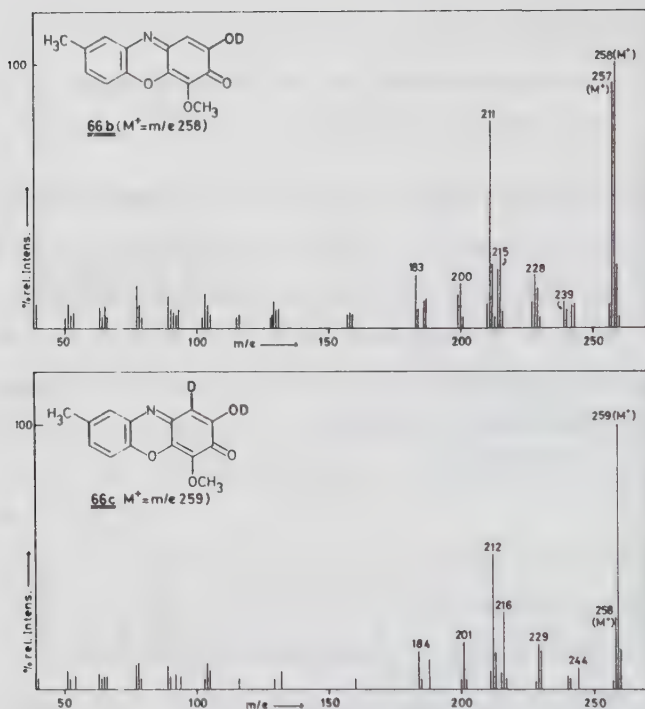


Abb.80: MS von a) 2- $[D]$ hydroxy-4-methoxy-8-methylphenoxazon (66b, $M^+ = m/e$ 258) neben unmarkiertem 66 ($M^+ = m/e$ 257)
 b) 2- $[D]$ hydroxy-4-methoxy-8-methyl- $[1-D]$ phenoxazon (66c, $M^+ = m/e$ 259) neben sehr wenig 66b

leider ist es bei der Umsetzung mit $H_2^{18}O$ (siehe S.138) aufgrund eines zu geringen Reaktivitätsunterschiedes zwischen der Hydroxygruppe an C-2 und der Carbonylfunktion von 66 nicht möglich, eines dieser beiden Sauerstoffatome selektiv zu markieren: man erhält nur die dimarkierte Verbindung 66a. Die Tatsache, daß das Fragment bei M-46ME im Spektrum von 66a nur noch monomarkiert ist, erlaubt jedoch keine Entscheidung zwischen den beiden zur Dis-

kussion stehenden Mechanismen, da nicht gesagt werden kann, welches der beiden markierten Sauerstoffatome in die abgespaltene Elementkombination eingebaut wird.

Die Spektren der deuteriummarkierten Verbindungen 66b und 66c sind dagegen im Einklang mit dem Vorschlag des "Ameisensäure-Mechanismus": Abspaltung von HCOOD aus den Molekülen führt zu den Fragmenten m/e 211 im MS von 66b und m/e 212 im Spektrum von 66c. Wäre der Zweistufenmechanismus wirksam, müßte das Fragment in beiden Spektren um jeweils eine Masseneinheit zu höheren Massen verschoben erscheinen.

Sieht man von dem Fragment bei M-46ME ab, entspricht der MS-Zerfall von 66 demjenigen des 4-Methoxyphenoxazons 30 (vgl.S.51ff). Die dort abgeleiteten Genesewege sind mit der Lage der entsprechenden Fragmentionen in den Spektren von 66a-c in Übereinstimmung.

2.5.3.10. Fazit von Kap.2.5.3.9.

1. Das Auftreten eines intensiven Fragmentes bei M-46ME wird sowohl im Spektrum des 4-Hydroxy-2-methoxyphenoxazons 62 als auch beim MS-Zerfall des 2-Hydroxy-4-methoxyphenoxazons 66 beobachtet. Es stellt daher ein Charakteristikum für zwei verschiedene Substitutionsmuster im Ring C dar.
2. Deutliche Unterschiede in der Intensität dieses Fragmentes - hervorgerufen durch unterschiedliche Bildungsmechanismen - erlauben die massenspektrometrische Differenzierung zwischen 66 und dem 4-Methoxyphenoxazon 30, deren Fragmentierungsverhalten im übrigen verwandt ist. Analoge Beziehungen bestehen zwischen 62 und dem 2-Methoxyphenoxazon 29 (vgl.S.102ff).

2.5.3.11. Das Massenspektrum von 1,4-Dimethoxy-2-hydroxy-8-methylphenoxazon(67)

Das Spektrum von 67 muß im Vergleich mit den Spektren des 2-Hydroxy-4-methoxyphenoxazons 66 und des 1,4-Dimethoxyphenoxazons 46 (vgl.S.74) gesehen werden. Abb.82 gibt die Spektren von 67 sowie der deuteriummarkierten Verbindung 67a wieder:

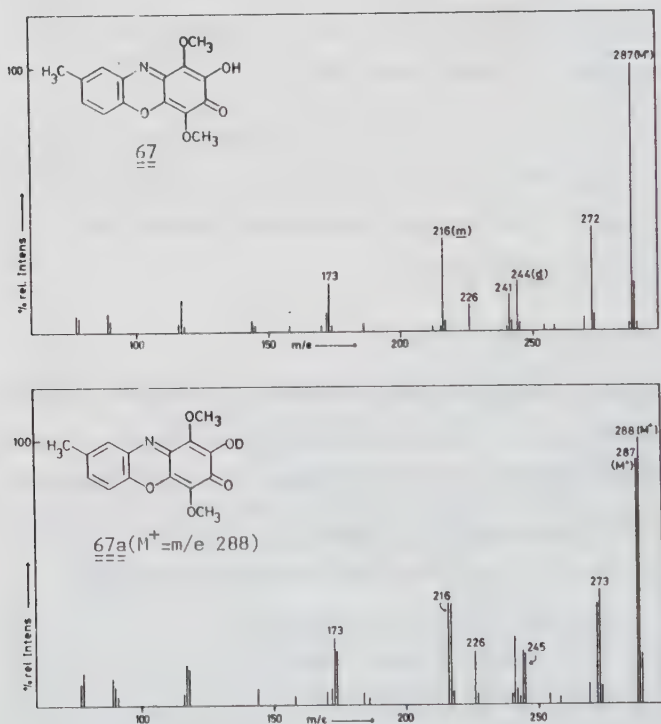


Abb.82: Massenspektren von

- a) 1,4-Dimethoxy-2-hydroxy-8-methylphenoxazon(67) und
- b) 1,4-Dimethoxy-2-[D]hydroxy-8-methylphenoxazon
(67a, $M^+ = m/e$ 288) neben unmarkiertem 67 ($M^+ = m/e$ 287)

Auffallend ist die hohe Intensität des Fragmentes m/e 216(m), welches in metastabilem Übergang durch CO-Eliminierung aus m/e 244(d) hervorgeht (Abb.83):

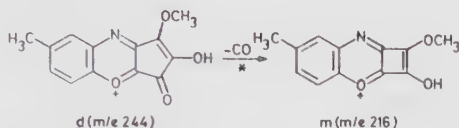


Abb.83: Bildung des Fragmentes m/e 216 im MS von 67 und Strukturvorschlag für dieses Ion(m)

ein entsprechendes Folgeion des Fragmentes d trat in den Spektren der bisher untersuchten Phenoxazone nur mit untergeordneter Intensität auf. Aus diesem Befund muß der Schluß gezogen werden, daß das gleichzeitige Vorliegen zweier Sauerstoffs substituenten (OCH_3 bzw. OH) offenbar zu einer besonderen Stabilisierung des Fragmentes m führt.

Das Auftreten der übrigen signifikanten Ionen im Spektrum von 67 ist auf den Ablauf von Fragmentierungsprozessen zurückzuführen, die bereits aus der Diskussion der Spektren von 46 und 66 bekannt sind:

Das Fragment M-CH_3 (m/e 272 in 67) tritt mit vergleichbarer Intensität im Spektrum von 46 auf. Das Fragment m/e 241 (M-46ME) ist in Analogie zum Spektrum von 66 zu sehen, denn auch in 67 sind die strukturellen Voraussetzungen zur Abspaltung von H_2CO_2 aus dem Molekülion nach dem "Ameisensäure-Mechanismus" gegeben. Als Charakteristikum der Methoxyfunktion an C-4 ist das Fragment d (m/e 244 in 67) allen drei Spektren gemeinsam (46, 66 und 67). Das Ion m/e 173 (in 67) entspricht dem Fragment m/e 157 im Spektrum von 46.

Das Spektrum der isotoopenmarkierten Verbindung 67a ist in Übereinstimmung mit unserer Interpretation des MS-Zerfalls von 67.

2.5.3.12. Das Massenspektrum von 8-Methyl-1,2,4-trimethoxyphenoxazon(68)

Zur Vervollständigung unserer massenspektrometrischen Untersuchungen an Phenoxazonen, die im Ring C hydroxy- bzw. methoxysubstituiert sind, haben wir das Trimethoxyphenoxazon 68 dargestellt und vermessen. Abb.84 zeigt neben dem MS von 68 die Spektren der beiden isotopenmarkierten Verbindungen 68a und 68b, die zur besseren Erkennung der Zerfallswege ebenfalls herangezogen wurden.

Das Auftreten des Fragmentes f ($M-H_2O$, m/e 283) entspricht unserer Erwartung, da durch das Vorliegen einer 2,4-Dimethoxy-Teilstruktur in 68 die erforderlichen Strukturparameter für die Bildung dieses Ions gegeben sind (vgl.S.67). Die Spektren von 68a und 68b sind im Einklang mit dem von uns vorgeschlagenen Entstehungsmechanismus: Während eines der Wasserstoffatome der Methoxyfunktion an C-2 von 68 in das eliminierte Wassermolekül eingebaut wird (m/e 285 in 68a), ist das Sauerstoffatom der Carbonylgruppe nicht Bestandteil der abgespaltenen Elementkombination (in 68b: Erhalt der ^{18}O -Markierung des Molekülions im Fragment f).

Auffallend im MS von 68 ist das mit hoher Intensität auftretende charakteristische Fragment m/e 268 ($M-(H_2O+CH_3)$). Wir führen die Bildung dieses Ions auf die Abspaltung eines Methylradikals aus der Methoxygruppe von f zurück und diskutieren die Entstehung des Oxoniumions n zur Erklärung der hohen Stabilität des Fragmentes (Abb.85):

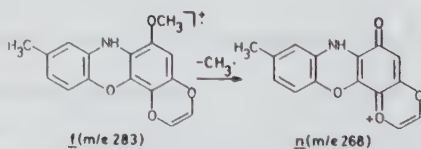


Abb.85: Vorschlag zur Bildung und Struktur des Fragmentes m/e 268 im MS von 68



Abb.84: MS von a) 8-Methyl-1,2,4-trimethoxyphenoxazon(68),
 b) 1,4-Dimethoxy-2-[D₃]methoxy-8-methylphenoxazon(68a) und
 c) 8-Methyl-1,2,4-trimethoxy-[Carbonyl-¹⁸O]phenoxazon(68b,
 M⁺ = m/e 303, 49%) neben unmarkiertem 68 (M⁺ = m/e 301, 51%)

Das intensive Fragment m/e 172 wird offenbar durch dreimalige Eliminierung von $\text{CO} + \text{CH}_3$ aus dem Molekölion gebildet. Wir schlagen als Möglichkeit für die Formulierung dieser Prozesse die in Abb.86 wiedergegebene Fragmentierungssequenz vor:

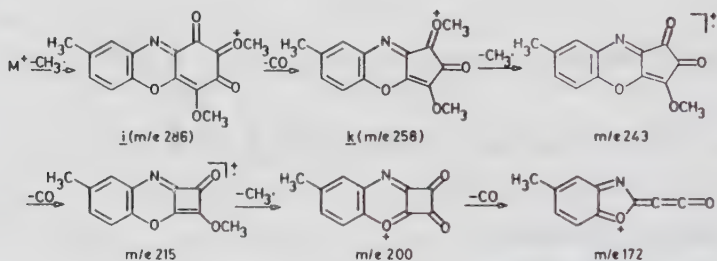


Abb.86: Bildung von m/e 172 beim MS-Zerfall von $\underline{\underline{68}}$: Vorschlag für den Geneseweg und die Strukturen der entstehenden Ionen

Die Formulierung von Ionenstrukturen mit kumulierten Doppelbindungen ist im Zuge massenspektrometrischer Fragmentierungsprozesse nicht ungewöhnlich^{108,109)}.

Die Genese des Fragmentes $\text{M}-\text{CH}_3$ (m/e 286 in $\underline{\underline{68}}$) ist erwartungsgemäß nicht einheitlich: Im Spektrum von $\underline{\underline{68a}}$ ist eine Aufspaltung in die Ionen m/e 289 ($\text{M}-\text{CH}_3$) und m/e 286 ($\text{M}-\text{CD}_3$, Hochauflösung) zu beobachten, die bereits aus den Spektren der isotopenmarkierten 2,4-Dimethoxyphenoxazone $\underline{\underline{31c}}$ und $\underline{\underline{31d}}$ (vgl.S.62) bekannt ist.

2.5.3.13. Fazit von Kap.2.5.3.11. und 2.5.3.12.

1. Auch die Massenspektren des 1,4-Dimethoxy-2-hydroxyphenoxazons $\underline{\underline{67}}$ und des 1,2,4-Trimethoxyphenoxazons $\underline{\underline{68}}$ sind durch das Auftreten charakteristischer Fragmente gekennzeichnet, die in den Spektren der zuvor von uns untersuchten Verbindungen mit anderen Substitutionsmustern im Ring C

nicht beobachtet wurden. Das Spektrum von 67 wird durch die Bildung des Fragmentes m geprägt (d-CO), während das Auftreten des Ions n (f-CH₃) im MS von 68 von besonderem diagnostischem Wert für das Vorliegen einer 1,2,4-Trimethoxy-Substitution anzusehen ist.

2. Neben den charakteristischen Fragmenten treten in den Spektren von 67 und 68 solche Ionen auf, die aufgrund des Vorliegens bestimmter Teilstrukturen im Molekül zu erwarten sind: Das Fragmentierungsverhalten von 67 zeigt Ähnlichkeit mit dem MS-Zerfall des 2-Hydroxy-4-methoxyphenoxazons 66 und des 1,4-Dimethoxyphenoxazons 46, während das Vorliegen einer 2,4-Dimethoxy-Teilstruktur in 68 insbesondere Anlaß zur Bildung des Fragmentes f(M-H₂O) gibt.

2.6. Die Massenspektren hydroxy- und methoxysubstituierter p-Benzochinone

In den Massenspektren der von uns untersuchten Phenoxazone hatten wir spezifische Fragmentierungsprozesse aufgefunden. Unsere Vorschläge für die Mechanismen, die diesen Reaktionen zugrunde liegen, erfordern das Vorliegen struktureller Parameter, wie sie auch in entsprechenden hydroxy- und methoxysubstituierten p-Benzochinonen gegeben sind. (Über den MS-Zerfall derartiger Benzochinone ist bisher nur wenig gearbeitet worden¹¹⁰).

Wir haben einige entsprechend substituierte Benzochinone synthetisiert und deren Massenspektren studiert, um zu überprüfen, ob die für die Phenoxazone charakteristischen Fragmentierungsreaktionen auch hier noch anzutreffen sind. Die untersuchten Chinone sowie die mit ihnen strukturell vergleichbaren Phenoxazone sind in Abb.87 zusammengestellt:

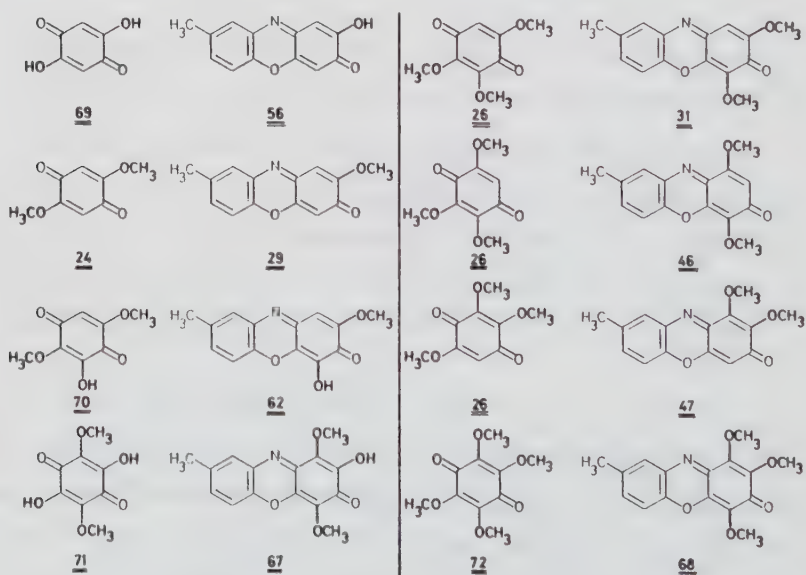


Abb.87: massenspektrometrisch untersuchte Benzochinone und die zu ihnen strukturell korrespondierenden Phenoxazone

Wir fanden, daß die Vergleichbarkeit zwischen dem MS-Zerfall der Benzo-
chinone und Phenoxazone nur in sehr beschränktem Umfang gegeben ist.

Spezifische Fragmentierungen wie etwa die Abspaltung von H_2O oder H_2CO_2
aus dem Molekölion, die zu den Hauptfragmenten der Spektren eines 2,4-Di-
methoxyphenoxazons und eines 4-Hydroxy-2-methoxyphenoxazons führen, sind
in den Spektren der korrespondierenden Benzoquinone - falls überhaupt
vorhanden - von untergeordneter Bedeutung.

Dominant sind dagegen in den Spektren aller untersuchten methoxysubsti-
tuierten Benzochinone Fragmentsequenzen, die nach einem Primärverlust
eines CH_3 -Radikals aus dem Molekölion durch sukzessive Abspaltung von
Kohlenmonoxid und Formaldehyd zustande kommen und zu intensiven Sekundär-
fragmenten führen. Abb.88 gibt als Beispiel das Massenspektrum von
2,3,5-Trimethoxy-1,4-benzochinon(26) wieder. Für die Entstehung der
einzelnen Fragmente diskutieren wir die in Abb.89 wiedergegebenen
Genesewege.

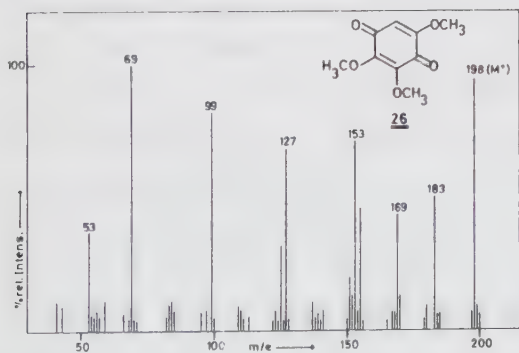


Abb.88:
Massenspektrum von
2,3,5-Trimethoxy-1,4-
benzochinon(26)

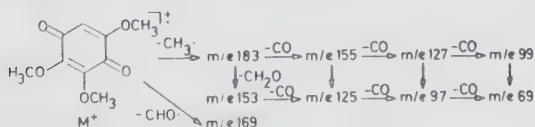


Abb.89: MS-Zerfall
von 26

2.7. Thermolyse von 2,4-Dimethoxy-8-methylphenoxazon(31)

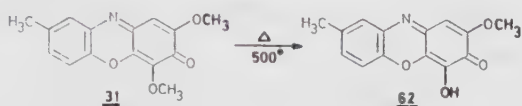
Auf die Zusammenhänge zwischen massenspektrometrischer und thermischer Fragmentierung wurde bereits eingegangen (vgl.S.6). Eine Reihe von Publikationen befaßt sich mit dem Vergleich beider Methoden hinsichtlich der ablaufenden Zerfallsreaktionen. Ein ausgeprägter Primärverlust kleiner Neutralkomplexe im Massenspektrum läßt sich dabei vielfach auch im Thermolyseexperiment nachvollziehen. Dies gilt z.B. für den CO-Verlust aus Benzochinonen^{111,112}) und Benzoxazinonen²¹).

Die Thermolyse von Phenoxazonen wurde bisher noch nicht untersucht. Besonders das unerwartete MS-Fragmentierungsverhalten der 2,4-Dimethoxyphenoxazone unter Bildung des Fragmentes $f(M-H_2O)$ läßt eine Untersuchung des thermischen Zerfalls dieser Substanzen interessant erscheinen, da evtl. auch hier auftretende unerwartete Reaktionsprodukte im Gegensatz zur Massenspektrometrie in Substanz isoliert und damit einer Struktur- aufklärung zugeführt werden können.

Die detaillierte Untersuchung der Thermolyse von Phenoxazonen war nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit. In ersten Versuchen haben wir jedoch in Anlehnung an bekannte Versuchsaufbauten^{25,113}) das 2,4-Dimethoxyphenoxazon 31 einer sogenannten "Flash-Vakuum-Thermolyse"²⁵) unterworfen. Dieses Verfahren gewährleistet eine optimale Annäherung der Thermolyseparameter an die Verhältnisse im Massenspektrometer: Die Umsetzung findet in der Gasphase bei niedrigem Druck statt, wobei es aufgrund der kurzen Kontaktzeit der Substanz mit der heißen Reaktionszone gelingt, unter weitgehender Vermeidung von Sekundärprozessen die Primärthermolyseprodukte in guter Ausbeute zu fassen. Als Pendant zu diesen Produkten sind in erster Linie die Fragmente im oberen Massenbereich des Massenspektrums der unter-

suchten Verbindung zu sehen.

Bei einer Temperatur von 500°C erhielten wir in hoher Ausbeute als Hauptthermolyseprodukt das 4-Hydroxy-2-methoxyphenoxazon 62, das anhand seines charakteristischen Massenspektrums (vgl.S.103) identifiziert wurde:



Neben der Synthese mittels "Kehrmann-Reaktion" (siehe S.136) steht damit eine weitere Möglichkeit zur präparativen Darstellung von 4-Hydroxy-2-methoxyphenoxazonen zur Verfügung, die auf der selektiven Spaltung der Etherfunktion an C-4 eines 2,4-Dimethoxyphenoxazons im Zuge der Thermolyse beruht. Derartige Etherspaltungen sind literaturbekannt¹¹⁴⁻¹¹⁶⁾. So beträgt die Ausbeute an Phenol bei der Thermolyse des Anisols bis zu 66%¹¹⁴⁾.

Bei einer Erhöhung der Temperatur und damit der zugeführten Energie ist die Bildung weiterer Primärthermolyseprodukte zu erwarten, wobei allerdings die Notwendigkeit des schnellen und effektiven Abfangens der Reaktionsprodukte einen gesteigerten apparativen Aufwand erfordert. Die Untersuchungen zur Thermolyse von Phenoxazonen sollen in einer an die vorliegende Arbeit anschließenden Studie vertieft werden.

2.8. Synthese der Phenoxazone und Benzochinone

2.8.1. Aufbau des Phenoxazonringsystems

Zur Synthese von Phenoxazonen steht eine Reihe verschiedener Verfahren zur Verfügung. In allen Fällen werden zunächst die Ringe A und C getrennt dargestellt, bevor in abschließenden Reaktionen der Ring B des Phenoxazonringsystems gebildet wird¹¹⁷⁻¹²⁴).

Zwei Verfahren haben allgemeinere Bedeutung für die Synthese einer größeren Anzahl von 2-Amino- und 2-Hydroxyphenoxazonen erlangt. Sie verlaufen im Gegensatz zu den anderen Verfahren mit meist befriedigenden bis guten Ausbeuten und sind auch bezüglich ihrer Reaktionsmechanismen genauer untersucht worden. Darüberhinaus wirft die Darstellung der Ausgangsverbindungen keine allzu großen synthetischen Probleme auf. Es handelt sich um

1. die "Aminophenoloxydation"^{117,123}) und
2. die "KEHRMANN-Reaktion"^{117,124,125}).

Wir haben beide Methoden - insbesondere die "KEHRMANN-Reaktion" - zur Synthese unserer Zielverbindungen eingesetzt.

2.8.1.1. Die "Aminophenoloxydation"

Durch Aminophenoloxydation wurde die überwiegende Zahl der bekannten 2-Aminophenoxazone, insbesondere der Actinomycine¹²⁶) synthetisiert: Ein o-Aminophenol (73) wird dabei mit einem Oxydationsmittel (z.B. Kaliumhexacyanoferrat(III)) umgesetzt, das einen Teil der Ausgangssubstanz zum o-Chinonimin (74) oxydiert. Dieses reagiert dann mit unverändertem Aminophenol unter intermediärer Bildung des entsprechenden o-Hydroxyphenylchinonimins (75) zu einem 2-Aminophenoxazon (76) weiter (Abb.90)¹¹⁷);

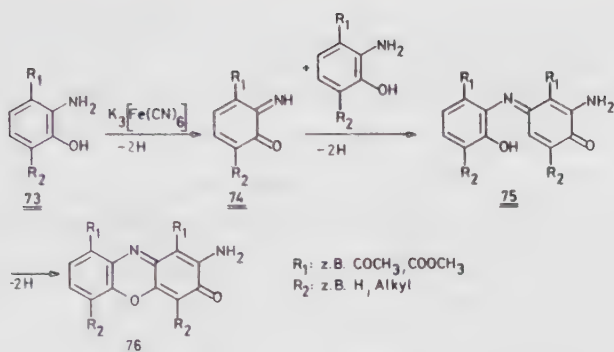
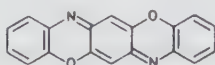


Abb.90: mechanistischer Ablauf der "Aminophenoloxydation" zur Darstellung von 2-Aminophenoxazonen nach¹¹⁷⁾

Man gelangt auf diese Weise zu Phenoxazonen, die in den Positionen 1 und 9 bzw. 4 und 6 symmetrisch substituiert sind. Durch Umsetzung mit wässrigen Säuren - z.B. Essigsäure^{127,130)} - lassen sich 2-Aminophenoxazone in 2-Hydroxyphenoxazone überführen.

2.8.1.2. Die "KEHRMANN-Reaktion"

In der KEHRMANN-Reaktion¹²⁴⁾ wird ein o-Aminophenol mit einem Hydroxy- (oder Alkoxy-)benzochinon zur Umsetzung gebracht. Die Reaktion kann unter Bildung unterschiedlich substituiert Phenoxazone auf drei verschiedenen Wegen ablaufen (Abb.91: A,B und C), deren Anteil am Reaktionsgeschehen von der Substitution der Reaktionspartner abhängig ist. Man erhält also in der Regel ein Produktgemisch. Daneben muß mit dem Auftreten von Redoxreaktionen und weiterer Nebenreaktionen, wie z.B. der Bildung von Triphendioxazinen (77=unsubstituiertes Triphendioxazin) gerechnet werden¹²⁵⁾.



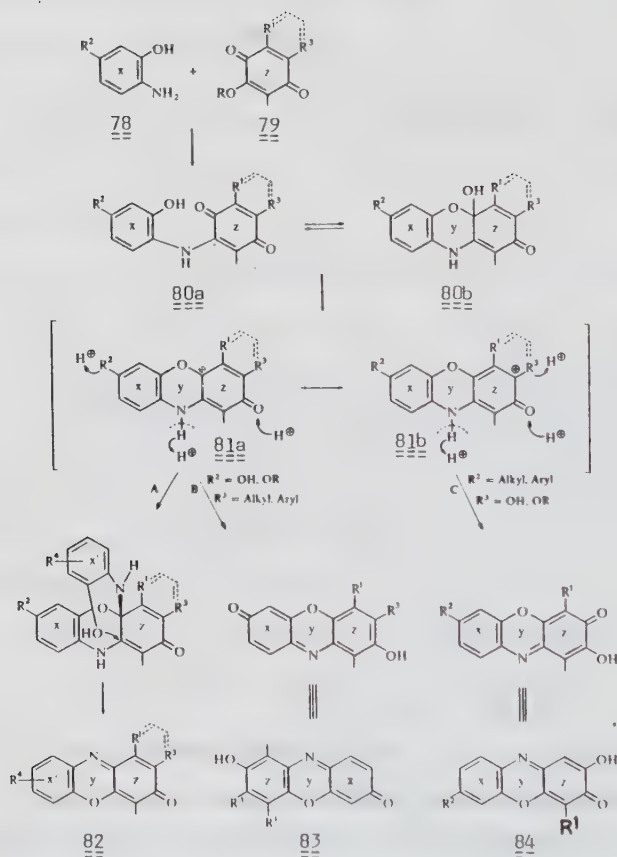


Abb.91: mechanistischer Ablauf (Alternativen A,B und C) der KEILMAN-Reaktion zur Darstellung von Phenoxazonen nach¹²⁴⁾

Entscheidend ist, daß im Primärschritt der Reaktion nicht – wie es ursprünglich formuliert worden war¹²⁸⁾ – eine Schiff'sche Base durch Reaktion der Aminogruppe des o-Aminophenols mit dem Chinoncarbonyl entsteht, sondern

durch nucleophile Substitution einer Hydroxy-(oder Alkoxy-)gruppe des Benzochinons durch die Aminofunktion ein Aminobenzochinon 80a gebildet wird. MUSSO konnte diesen Mechanismus durch IR-Spektroskopie von Umsetzungsprodukten ^{13}C -markierter Benzochinone belegen¹²⁵⁾.

Werden Benzochinone und Aminophenole wie üblich in saurem Milieu miteinander umgesetzt, können Zwischenprodukte nicht isoliert werden. SCHÄFER gelang es in einigen Fällen, die Aminobenzochinone 80a bzw. die mit diesen im Gleichgewicht stehenden Halbketale 80b als Zwischenstufe der Reaktion zu isolieren, indem er zunächst in neutralem Medium arbeitete und erst im Anschluß daran durch Anwendung saurer Bedingungen aus den Halbketalen die Phenoxazone erzeugte¹²⁴⁾.

SCHÄFER konnte auch zeigen, daß die KEHRMANN-Reaktion immer dann in guter Ausbeute zu einem einheitlichen Reaktionsprodukt führt, wenn 2,5-Dihydroxy- (bzw. 2,5-Dialkoxy-)1,4-benzochinone zum Einsatz kommen, die außerdem noch einen elektronenziehenden Substituenten tragen. In diesen Fällen wird eine nucleophile Substitution am benachbarten C-Atom begünstigt und es entsteht auf dem Reaktionsweg C (Abb.91) einheitlich das entsprechende 2-Hydroxyphenoxazon(84). Bei der Synthese des Cinnabarins(10), eines roten Pilzpigmentes, wurde von diesem Umstand Gebrauch gemacht (Abb.92)¹²⁹⁾.

Setzt man dagegen das Aminophenol 91 mit dem 2.5-Dihydroxybenzochinon 92 um, beobachtet man ausschließlich die Bildung des 2-Hydroxyphenoxazons 93, aber nicht die Entstehung von 94 (Abb.93)¹³⁰⁾:

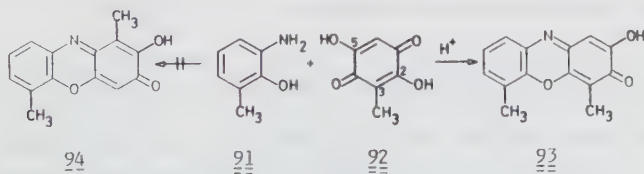


Abb.93: Darstellung von 93 nach¹³⁰⁾

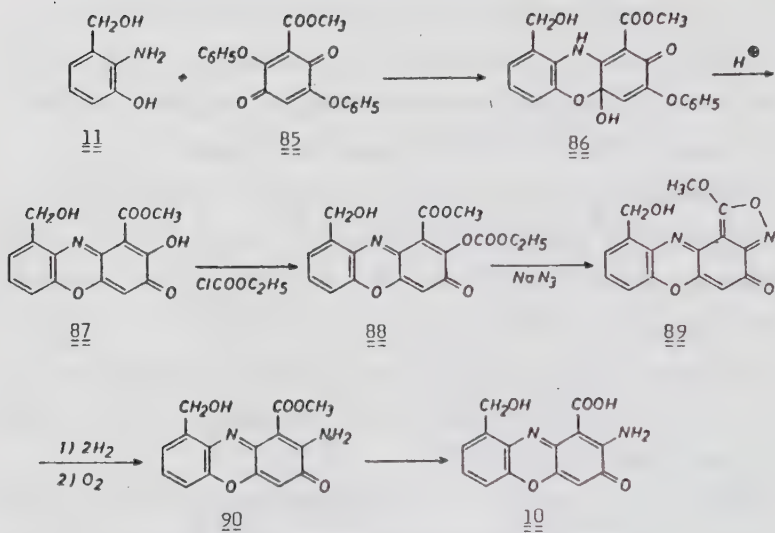


Abb.92: Synthese des Cinnabarins(10) nach¹²⁹⁾

Auch dieser Befund läßt sich aufgrund des elektronischen Einflusses der Methylgruppe des Benzochinons gut in das mechanistische Bild einfügen: Die schwach elektronenliefernde Wirkung dieses Substituenten erschwert den nucleophilen Angriff der Aminogruppe auf das benachbarte C-2 des Chinons gegenüber einer Reaktion an C-5, so daß nur letztere abläuft. Die KEHRMANN-Reaktion unter Verwendung von 2,5-Dihydroxybenzochinonen eignet sich somit insbesondere zur gezielten Darstellung auch unsymmetrisch substituierter Phenoxazone.

2.8.2. Darstellung von Michigazon(27)

Unser erstes Ziel war die Darstellung von Michigazon(27). In Anbetracht des Vorliegens einer Methoxygruppe an C-2 des Phenoxazonringsystems lag

es nahe, zur Synthese des Moleküls die KEHRMANN-Reaktion zu benutzen, da 2-Hydroxyphenoxazone durch Umsetzung mit Methyljodid oder Diazomethan leicht in 2-Methoxyphenoxazone überführt werden können⁸²⁾. Als "Bausteine" benötigt man 3-Amino-4-hydroxybenzylalkohol(14, Darstellung siehe S.33) und 2,5-Dihydroxy-3-methoxy-1,4-benzochinon(98), das wir in Anlehnung an bestehende Vorschriften synthetisiert haben (Abb.94)¹³¹⁻¹³³⁾:

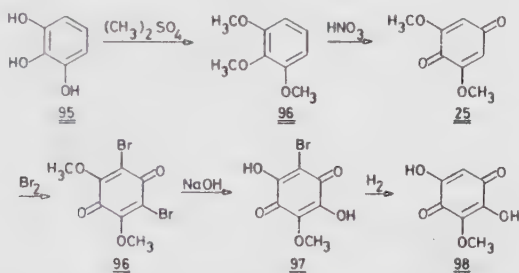


Abb.94: Darstellung von 98 aus 95 nach¹³¹⁻¹³³⁾

Aufgrund des elektronenliefernden Charakters der Methoxygruppe an C-3 von 98 sollte ein nucleophiler Angriff der Aminogruppe von 14 auf das benachbarte C-2 des Chinons ungünstiger sein als auf das C-5 (vgl. Abb.93). Weiterhin muß nach dem allgemeinen Schema für die KEHRMANN-Reaktion (S.124) mit einer Reaktion an C-3 des Chinons unter Ablauf des Reaktionsweges A gerechnet werden. Ein nucleophiler Angriff auf das C-3 erscheint jedoch wegen der benachbarten Hydroxygruppe an C-2 (Substituent 1.Ordnung) ebenso unvorteilhaft wie eine Reaktion an C-2 selbst. Wir erwarteten daher einen bevorzugten Reaktionsablauf an C-5 des Chinons unter Bildung des gewünschten 2-Hydroxy-4-methoxyphenoxazons 99. Das Experiment bestätigte diese Erwartung und führte nach anschließender Umsetzung mit Diazomethan zu einer Gesamtausbeute von 45% (bezogen auf 98) an Michigazon(27, Abb.95):

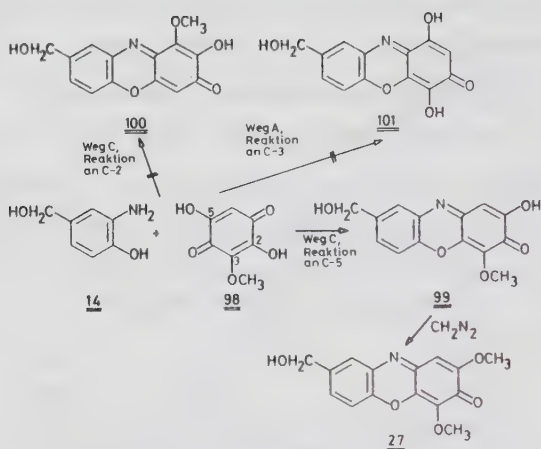


Abb.95: Darstellung von Michigazon(27) aus 14 und 98
(vgl. Abb.91, S.124)

Die gleichzeitige Entstehung der Phenoxazone 100 und 101 wurde unter den angewendeten Standardreaktionsbedingungen (siehe S.200) nicht beobachtet. Es mußte allerdings noch eindeutig bewiesen werden, daß es sich bei dem synthetisierten 2-Hydroxyphenoxazon tatsächlich um 99 und nicht um die isomere Verbindung 100 handelt. Die Entscheidung zwischen diesen beiden alternativen Möglichkeiten läßt das ^1H -NMR-Spektrum des 4-Methoxyphenoxazons 30 zu, das durch die im folgenden beschriebene Reaktionssequenz aus 99 zugänglich ist.

Mit Thionylchlorid/Chloranil reagieren 2-Hydroxyphenoxazone in benzolischer Lösung zu 2-Chlorphenoxazonen¹³⁴⁾. Diese sind durch katalytische Hydrierung an PtO_2 in Triethylamin dehalogenierbar, so daß damit auch Phenoxazone zugänglich werden, die in Position 2 unsubstituiert sind¹¹⁷⁾. (Die außerdem auftretende Reduktion des Phenoxazons zum 3-Hydroxyphenoxazin (vgl.S.28)

wird beim Aufarbeiten des Ansatzes durch Luftoxydation wieder rückgängig gemacht.)

Durch Umsetzung von 99 mit Thionylchlorid erhielten wir das Dichlorphenoxazon 102 (Abb.96), in dem beide OH-Funktionen durch Halogenatome substituiert worden sind (erkennbar im MS anhand der Lage und Elementarzusammensetzung des Molekülions). Durch anschließende Hydrierung konnte.

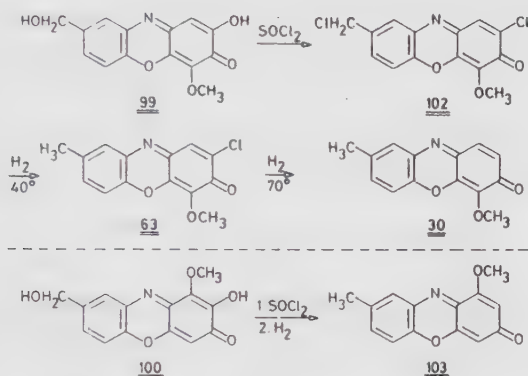
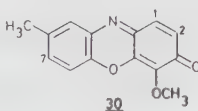
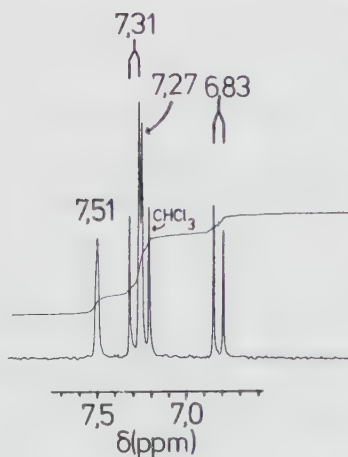


Abb.96: Darstellung von 30 aus 99 (Aus 100 müßte auf dem gleichen Wege 103 entstehen)



- 1-H 7,31 ppm
- 2-H 6,83 ppm
- 6-H } 7,27 ppm
- 7-H }
- 9-H 7,51 ppm

Abb.97: ^1H -NMR-Spektrum (FT, 180 MHz, Ausschnitt) von 30 und Zuordnung der Signale

102 in zwei Stufen über die Monochlorverbindung 63 ($^1\text{H-NMR-Spektrum}$: Signal für die Methylgruppe am Ring A) in das 4-Methoxyphenoxazon 30 überführt werden, dessen $^1\text{H-NMR-Spektrum}$ in Abb.97 wiedergegeben ist. Das 2-H erscheint als Dublett mit $J=10\text{Hz}$ entsprechend einer Kopplung mit dem 1-H. Im anderen noch denkbaren Fall der Entstehung von 103 (Abb.96) hätte man ein Dublett mit $J=2\text{Hz}$ erwartet, bedingt durch eine Kopplung zwischen dem 2-H und dem 4-H (vgl. dazu S.34/35).

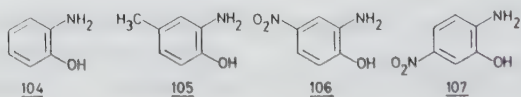
Das Vorliegen einer 2-Hydroxy-4-methoxystruktur in 99 (und damit einer 2,4-Dimethoxystruktur in 27) ist damit zweifelsfrei bewiesen. Synthetisches Michigazon(27) stimmt in allen geprüften Eigenschaften mit dem genuinen Material überein (vgl.S.37). Die KEHRMANN-Reaktion stellt also eine einfache Synthesemöglichkeit für dieses Molekül bereit.

2.8.3. Darstellung weiterer Phenoxazone mittels KEHRMANN-Reaktion

2.8.3.1. Einsatz unterschiedlich substituierter 2-Aminophenole

Der glatte und einheitliche Verlauf der Umsetzung von 14 mit 2,5-Dihydroxy-3-methoxy-1,4-benzochinon(98) veranlaßte uns zum Einsatz der KEHRMANN-Reaktion für die Synthese weiterer Phenoxazone, die wir für die massenspektrometrische Untersuchung benötigten.

Zunächst fanden wir, daß unterschiedlich substituierte Aminophenole - wie die Verbindungen 104-107 - in gleicher Weise wie 14 mit 98 glatt umgesetzt werden können. Die KEHRMANN-Reaktion läuft also - soweit wir das untersucht haben - unabhängig von Art und Stellung des Substituenten in der Aminophenolkomponente ab.



2.8.3.2. Darstellung von 2,4-Dihydroxyphenoxazonen

Setzt man 2,5-Dimethoxy-3-hydroxy-1,4-benzochinon(70) in die KEHRMANN-Reaktion ein, sollte der nucleophile Angriff des Aminophenols aus den gleichen Gründen wie bei 98 bevorzugt an C-5 erfolgen. Wir haben 70 in Anlehnung an bekannte Vorschriften synthetisiert (Abb.98)¹³¹⁾ und fanden bei der Umsetzung mit dem Aminophenol 105 die erwartete Bildung des 2,4-Dihydroxyphenoxazons 57 (vgl. Abb.91, S.124: Reaktionsweg C) durch unseren experimentellen Befund voll bestätigt (Abb.99). Die 2,4-Anord-

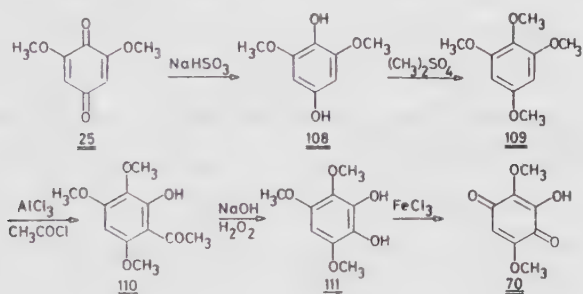


Abb.98: Darstellung von 70 aus 25 nach¹³¹⁾

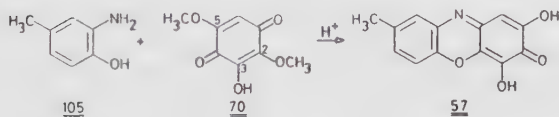


Abb.99: Darstellung von 57 aus 105 und 70
mittels KEHRMANN-Reaktion

nung der beiden Hydroxygruppen in 57 konnte durch die Bildung des 2,4-Dimethoxyphenoxazons 31 bei der Umsetzung mit Diazomethan bewiesen werden (siehe S.212/213).

2.8.3.3. Darstellung von 1,4-Dimethoxy-2-hydroxyphenoxazonen

Von besonderem Interesse war für uns nun die Frage, ob auch das tetra-substituierte 2,5-Dihydroxy-3,6-dimethoxy-1,4-benzochinon(71) noch nach KEHRMANN-Bedingungen umgesetzt werden kann, da auf diesem Wege ein präparativer Zugang zu solchen Phenoxazonen ermöglicht würde, die im Ring C dreifach hydroxy- bzw. methoxysubstituiert sind. Ein Erfolg war fraglich, da hier der nucleophile Angriff des Aminophenols auf das C-2 bzw. C-3 des Chinons durch die Nachbarständigkeit eines Substituenten 1. Ordnung erschwert wird (vgl.S.127). Wir haben 71 nach bekannten Vorschriften dargestellt (Abb.100)^{135,136}:

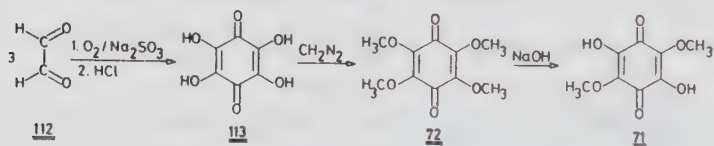


Abb.100: Darstellung von 71 aus 112 nach ^{135,136}

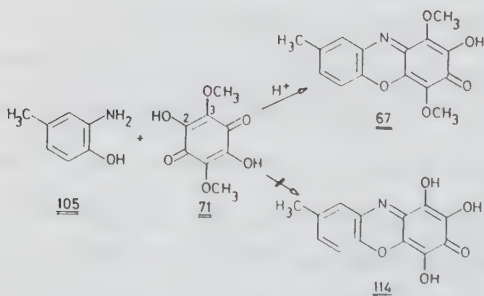


Abb.101: KEHRMANN-Reaktion: Darstellung von 67 aus 105 und 71

Wie das Experiment zeigt, kann auch dieses Chinon zur Reaktion gebracht werden, wobei allerdings - der Erwartung entsprechend - erheblich längere

Reaktionszeiten erforderlich sind (mehrere Stunden) als bei der Umsetzung von 98 (15 Min.). Als Reaktionsprodukt isolierten wir in mäßiger Ausbeute das Phenoxazon 67, das gemäß dem Reaktionsschema in Abb.91 (S.124) auf einen nucleophilen Angriff am C-2 des Chinons zurückzuführen ist. Die Bildung des zweiten noch denkbaren Phenoxazons 114 (Angriff am C-3 des Chinons) wurde nicht beobachtet (Abb.101).

2.8.3.4. Darstellung von 2-Hydroxy- und 4-Alkyl-2-hydroxyphenoxazonen

Die KEHRMANN-Reaktion mit 2,5-Dihydroxy-3-methyl-1,4-benzochinon(92) führt zur einheitlichen Bildung eines 2-Hydroxy-4-methylphenoxazons¹³⁰⁾ (vgl.S.125). Wir haben durch Umsetzung des Aminophenols 105 mit 92, 2,5-Dihydroxy-1,4-benzochinon(69) und 2,5-Dihydroxy-3-ethyl-1,4-benzochinon(115) in Analogie zu den Literaturbefunden in glatter und einheitlicher Reaktion die Phenoxazone 56, 58 und 59, die für unsere massenspektrometrischen Untersuchungen ebenfalls von Interesse waren, dargestellt (Abb.102). Die Benzochinone wurden in Anlehnung an eine für 69 bestehende Vorschrift¹³⁷⁾ aus den entsprechenden Hydrochinonen synthetisiert:

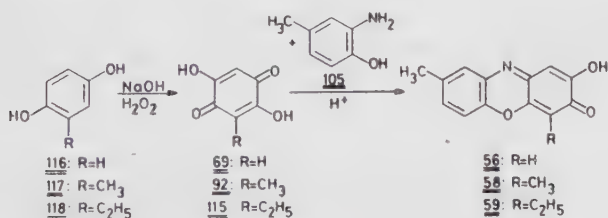
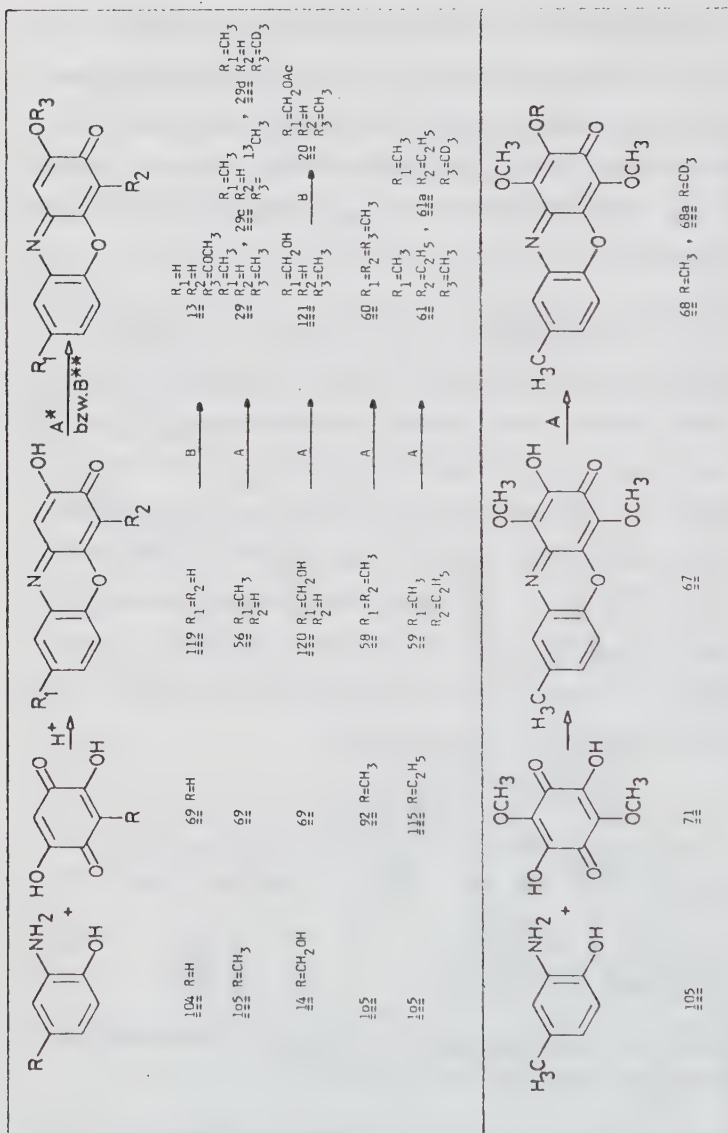


Abb.102: Darstellung von 56, 58 und 59 durch KEHRMANN-Reaktion
(Darstellung von 69, 92 und 115 nach ¹³⁷⁾)

2.8.4. Zusammenfassung der durchgeführten KEHRMANN-Reaktionen

Die folgende Tabelle (Tab.7) faßt alle von uns durchgeführten KEHRMANN-



Tab.7: Durch KEHRMANN-Reaktion dargestellte Phenoxazone

und deren Alkylierungs- bzw. Acetylierungsprodukte

A^{*}: Alkylierung mit Alkyljodiden/K₂CO₃ in Aceton oder mit Diazomethan

B^{**}: Acetylierung mit Acetanhydrid in Pyridin

-Reaktionen zusammen und listet die mit dieser Methode dargestellten Phenoxazone sowie deren Alkylierungs- und Acetylierungsprodukte auf. Die Produkte der Alkylierung des 2,4-Dihydroxyphenoxazons 57 sind hierbei nicht aufgeführt, da sie Gegenstand einer gesonderten Betrachtung im folgenden Kapitel sind.

2.8.5. Darstellung von 2-Alkoxy-4-hydroxyphenoxazonen und 2,4-Dialkoxyphenoxazonen

Bei der Alkylierung des 2,4-Dihydroxyphenoxazons 57 stellte sich heraus, daß die Hydroxygruppe an C-2 bezüglich der Umsetzung mit Diazomethan und Alkyljodiden wesentlich reaktiver als die Hydroxyfunktion an C-4 ist.

Setzt man 57 z.B. mit Methyljodid um, läßt sich nach kurzer Reaktionszeit das 4-Hydroxy-2-methoxyphenoxazon 62 einheitlich darstellen, das sich insbesondere im Massenspektrum in charakteristischer Weise vom isomeren 2-Hydroxy-4-methoxyphenoxazon 66 unterscheidet (vgl.S.103 und 109).

Ein Überschuß des Reaktionsmittels und längere Reaktionszeiten führen dann weiter zur Bildung des 2,4-Dimethoxyphenoxazons 31 (Abb.103):

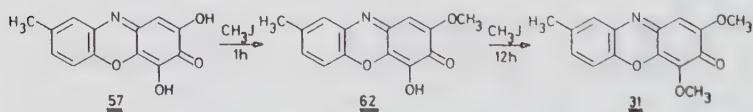
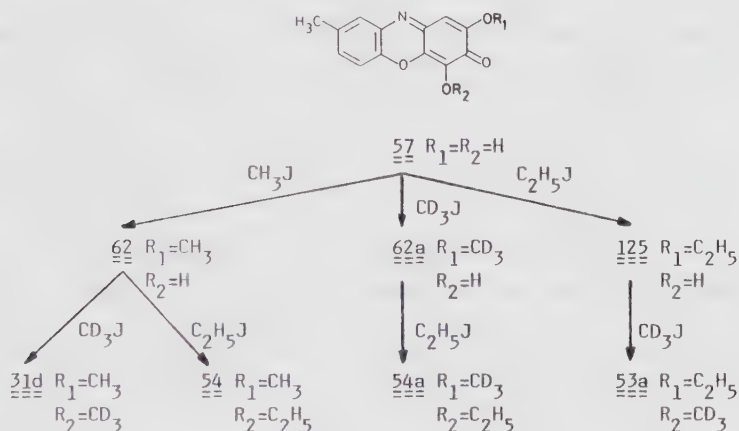


Abb.103: Umsetzung von 57 mit Methyljodid/ K_2CO_3 in Aceton

Neben der Thermolyse von 31 (vgl.S.120/121) steht damit ein zweites Verfahren zur Darstellung des 4-Hydroxy-2-methoxyphenoxazons 62 zur Verfügung. Darüberhinaus erlaubt die unterschiedliche Reaktivität der beiden Hydroxygruppen von 57 die Synthese symmetrischer und unsymmetrischer 2,4-Dialkoxyphenoxazone sowie die einfache Darstellung isoto-penmarkierter

Verbindungen, deren Synthese auf andere Weise aufwendiger gewesen wäre (31d, 53a, 54a und 62a). Die Übersicht in Tab.8 faßt die durch selektive Alkylierung von uns dargestellten Phenoxazone zusammen:

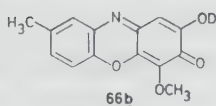


Tab.8: Durch selektive Alkylierung von 57 dargestellte Phenoxazone

2.8.6. Darstellung deuteriummarkierter Phenoxazone mittels CH₃OD

Im Zusammenhang mit der Klärung des Mechanismus der Wasserabspaltung aus den Molekülonen von 2,4-Dimethoxyphenoxazonen war der MS-Zerfall der an C-1 deuteriummarkierten Verbindung 31b (vgl.S.62) von Interesse, deren Darstellung durch Umsetzung des 2-Hydroxy-4-methoxyphenoxazons 66 mit CH₃OD und anschließende Methylierung gelang:

Beim Deuterium-Austausch war zunächst die Bildung des monodeuterierten Moleküls 66b zu erwarten; bei kurzer Reaktionsdauer ist dieses Produkt



auch entstanden. Beim mehrstündigen Rückflußkochen mit einem größeren Überschuß CH₃OD bildete sich jedoch eine dideuterierte Verbindung, wie anhand des Massenspektrums leicht erkennbar

war (66c, vgl.S.110). Aus dieser erhielten wir durch Umsetzung mit Methyljodid das monodeuterierte 2,4-Dimethoxyphenoxazon 31b (vgl.S.62), das ausschließlich an C-1 markiert war (^1H -NMR-Spektrum), neben undeutertem 31 (hervorgerufen durch eingeschleppte Feuchtigkeitsspurten). Eine naheliegende Erklärung finden die beobachteten Phänomene durch Keto-Enol-tautomere Formen von 66b (Abb.104):

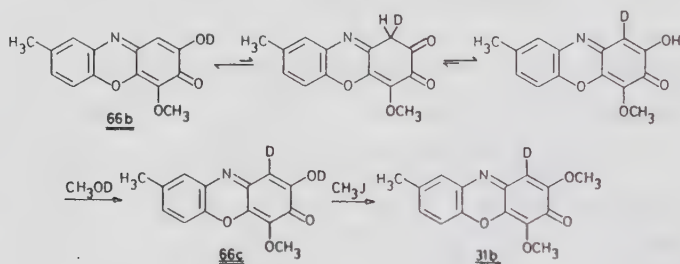
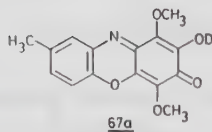


Abb.104: Darstellung von 31b aus 66b



Bei der Darstellung von [3-D]Kawain wurde ebenfalls von dieser Reaktionsfolge Gebrauch gemacht¹³⁸⁾.

Analog zu 66b war aus 67 das monodeuterierte Molekül 67a zugänglich (vgl.S.112).

2.8.7. Darstellung ^{18}O -markierter Phenoxazone mittels H_2^{18}O

Ein weiteres Problem bei der Klärung des Mechanismus der Wasserabspaltung aus den Molekülonen von 2,4-Dimethoxyphenoxazonen war die Bestimmung der Herkunft des Sauerstoffatoms, das in das eliminierte Wassermolekül eingebaut wird. Ein einfacher Zugang war - durch Umsetzung mit H_2^{18}O - zunächst nur zu solchen Phenoxazonen gegeben, die in der Carbonylfunktion spezifisch

^{18}O -markiert sind $^{77}\text{d},^{139}$). In Anlehnung an dieses Verfahren haben wir (unter Verwendung von H_2^{18}O mit einem ^{18}O -Gehalt von 60%) das 2,4-Dimethoxyphenoxazon 38 umgesetzt, um das isotopenmarkierte Molekül 38a zu erhalten (Abb.105):

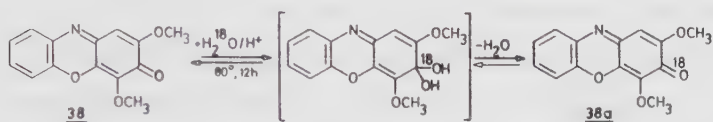
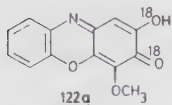


Abb.105: Darstellung von 38a

Nach 12-stündiger Reaktionszeit war die gesuchte Verbindung 38a zwar gebildet worden, jedoch machten wir die überraschende Beobachtung, daß daneben als Hauptumsetzungsprodukt der Reaktion eine laut MS di- ^{18}O -markierte Spezies von 2-Hydroxy-4-methoxyphenoxazon(122) entstanden war.

Die Methoxygruppen an C-2 und C-4 von 38 sind als Enoletherfunktionen



aufzufassen. Offenbar erfolgt unter den angewendeten Reaktionsbedingungen eine Hydrolyse der Enolethergruppe $^{140},^{141}$ an C-2, während die Methoxygruppe an C-4 nicht angegriffen wird, so daß

di- ^{18}O -markiertes 122a entsteht. Da die Hydrolyse einer Etherfunktion umso leichter erfolgt, je leichter sie gebildet wird, entspricht dieses Ergebnis der bereits beschriebenen höheren Reaktivität der Hydroxygruppe an C-2 von 2,4-Dihydroxyphenoxazonen im Zuge der Umsetzung mit Alkyljodiden oder Diazomethan (vgl.5.136).

Zur gleichen Verbindung 122a gelangten wir, indem wir 122 mit H_2^{18}O behandelten. Dabei gelang es - auch bei kurzer Reaktionszeit - nicht, ein monomarkiertes Molekül zu isolieren. Offenbar wird das Enolsauer-

stoffatom an C-2 (über die tautomere Ketoform) gleich schnell ausgetauscht wie das Ketosauerstoffatom an C-3. Da höhere Markierungen massenspektrometrisch nicht nachweisbar waren, kann eine Austauschreaktion an den anderen (Ether-)Sauerstoffatomen entsprechend der Erwartung ausgeschlossen werden.

Im Vergleich zum Austausch eines Enol- oder Ketosauerstoffatoms mit H_2^{18}O verläuft die Hydrolyse der Methoxygruppe an C-2 unter den angewendeten Reaktionsbedingungen langsamer, so daß das betreffende Sauerstoffatom einer Markierung schwerer zugänglich ist. Dieser Umstand ermöglichte die Isolierung von monomarkiertem 38a neben dimarkiertem 122a bei der Umsetzung von 38. Derselbe Reaktivitätsunterschied läßt sich zu einer Synthese von spezifisch in der Methoxygruppe an C-2 monomarkiertem 2,4-Dimethoxyphenoxazon (38b) aus di- ^{18}O -markiertem 122a nutzen (Abb.106): Umsetzung von 122a mit Diazomethan führt zunächst zu 38c, das nun in gleicher Weise mit unmarkiertem Wasser umgesetzt wird, wie zuvor 38 mit H_2^{18}O . Dabei fällt 38b neben 122 an.

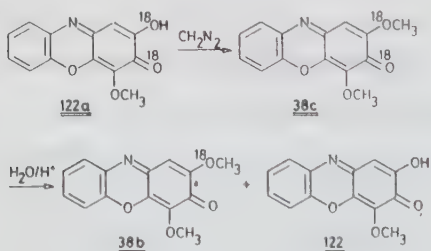
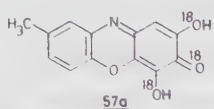


Abb.106: Darstellung von 38b aus 122a

Die Umsetzung des 2,4-Dihydroxyphenoxazons 57 mit H_2^{18}O resultierte in der Entstehung der tri- ^{18}O -markierten Verbindung 57a: Die OH-Gruppe an

C-4 zeigt also dasgleiche Reaktionsverhalten wie die entsprechende Funktion



an C-2. Die Verfügbarkeit von 57a ermöglichte uns die
Synthese des spezifisch in der Methoxygruppe an C-4
mono-¹⁸O-markierten 2,4-Dimethoxyphenoxazons 31a:

Man setzt zunächst mit Diazomethan zum tri-¹⁸O-markierten 31f um. Von dort
führt der Weg durch Rücktausch mit unmarkiertem Wasser in einem Schritt
neben 31g zu 66d in Analogie zur Bildung von 122 bei der Umsetzung von 38c
(s.o.). Mit Diazomethan wird 66d schließlich in 31a überführt (Abb.107):

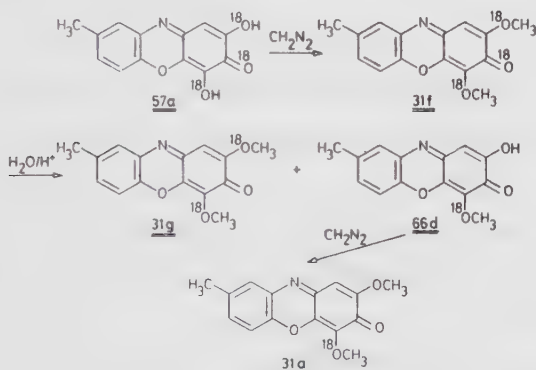
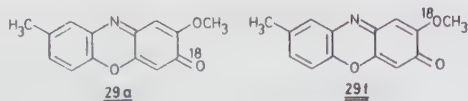


Abb.107: Darstellung von 31a aus 57a

Die Umsetzung von 2-Methoxy-8-methylphenoxazon(29) mit H₂¹⁸O geschah in
der Absicht, in Analogie zu den an 2,4-Dimethoxyphenoxazonen erzielten
Ergebnissen die beiden monomarkierten Verbindungen 29a und 29f herzustellen.



Die Realisierung wurde aber durch einen unerwarteten Umstand erschwert:

Die Methoxyfunktion an C-2 von 29 war erheblich reaktiver als diejenige der zuvor untersuchten 2,4-Dimethoxyphenoxazone. So sind in einer Lösung von 29 in wassergesättigtem Chloroform nach etwa 10-stündigem Aufbe-
wahren bei Raumtemperatur bereits erhebliche Mengen des 2-Hydroxyphen-
oxazons 56 nachweisbar. Die Hydrolyse der Etherfunktion läuft daher unter
den angewendeten Reaktionsbedingungen vergleichbar schnell ab wie der
Austausch des Carbonylsauerstoffatoms gegen das schwerere Isotop.
Eine spezifische ^{18}O -Markierung der Carbonylgruppe von 29 gelang dennoch,
wenn auch mit relativ geringerer Einbaurate als bei den 2,4-Dimethoxy-
phenoxazonen: Bricht man die Umsetzung nach ca. 5 Std. ab, gelingt es
immerhin noch, eine geringe Menge (ausreichend für die Aufnahme des
Massenspektrums) der nicht hydrolysierten monomarkierten Verbindung
29a zu isolieren. Die Reaktionszeit reicht zwar nicht aus, um an die
Einbaurate des eingesetzten H_2^{18}O (60%) heranzukommen; man erhält aber
einen analytisch gut auswertbaren ^{18}O -Gehalt von 26% in der gewünschten
Position (vgl.S.46).

Von einer Darstellung der Verbindung 29f mußte unter diesen Umständen
abgesehen werden. Das di- ^{18}O -markierte Molekül 29b war dagegen leicht
zugänglich (Abb.108):

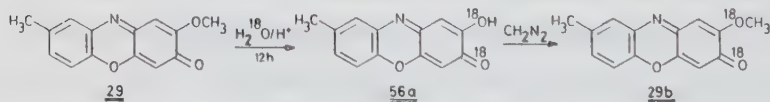
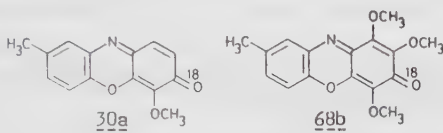


Abb.108: Darstellung von 29b aus 29

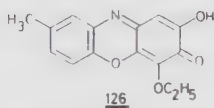
Aus dem 4-Methoxyphenoxazon 30 und dem 1,2,4-Trimethoxyphenoxazon 68
konnten wir in einheitlicher Reaktion die spezifisch in der Carbonyl-

gruppe mono-¹⁸O-markierten Verbindungen 30a und 68b erhalten. Die Methoxyfunktionen an C-1 und C-4 (vgl. mit den 2,4-Dimethoxyphenoxazonen) erwiesen sich unter den angewendeten Reaktionsbedingungen als stabil. Gleiches gilt für die Methoxygruppe an C-2 von 68, die offenbar durch die benachbarte funktionelle Gruppe an C-1 gegenüber einer Hydrolyse stabilisiert wird.



2.8.8. Darstellung von 4-Alkoxy-2-hydroxyphenoxazonen

Die selektive Hydrolysierbarkeit der Methoxygruppe an C-2 von 2,4-Dimethoxyphenoxazonen wird nach unserem Befund allgemein bei 4-Alkoxy-2-methoxyphenoxazonen angetroffen; sie läßt sich zur Synthese beliebiger 4-Alkoxy-2-hydroxyphenoxazone verwenden. So haben wir z.B. das 4-Ethoxy-



-2-hydroxyphenoxazon 126 durch saure Hydrolyse des 4-Ethoxy-2-methoxyphenoxazons 54 dargestellt, das seinerseits durch Alkylierung des 2,4-Di-

hydroxyphenoxazons 57 erhalten worden war (vgl.S.137).

2.8.9. Fazit von Kap. 2.8.5. bis 2.8.8.

1. 2,4-Dihydroxyphenoxazone (z.B. 57) lassen sich durch eine Abfolge selektiver Alkylierungen und durch saure Hydrolyse einer dabei entstandenen Methoxyfunktion an C-2 in folgende Verbindungen überführen:
 - a) 2-Alkoxy-4-hydroxyphenoxazone,
 - b) 2,4-Dialkoxyphenoxazone mit gleichen oder ungleichen Alkoxygruppen,
 - c) 4-Alkoxy-2-hydroxyphenoxazone.

2. Neben der literaturbekannten Darstellung von Phenoxazonen, die in der Carbonylfunktion ¹⁸O-markiert sind ^{77d,139)}, konnten wir unter Ausnutzung des Enolcharakters der Hydroxygruppen in Position 2 und 4 eines Phenoxazons sowie der selektiven Hydrolysierbarkeit einer als Enolether anzusehenden Methoxygruppe an C-2 eine Reihe weiterer spezifisch ¹⁸O- und deuteriummarkierter Phenoxazone synthetisieren.

2.8.10. Darstellung von 1-Chlor-2-hydroxy-4-methoxyphenoxazonen und 1-Chlor-2,4-dimethoxyphenoxazonen

Die Darstellung von 1-Chlor-2,4-dimethoxyphenoxazonen war erforderlich, um den Einfluß eines zusätzlichen Halogenatoms als Substituenten im Ring C von 2,4-Dimethoxyphenoxazonen auf den MS-Zerfall dieser Verbindungen studieren zu können (vgl.S.78). Wir fanden, daß ein leichter Zugang zu diesen Substanzen möglich ist, indem man die Hydrolyse des entsprechenden 2,4-Dimethoxyphenoxazons unter Zugabe von Salzsäure anstelle von Toluolsulfonsäure ¹³⁹⁾ durchführt: Setzt man z.B. 31 auf diese Weise um, erhält man als Hydrolyseprodukt neben dem 2-Hydroxy-4-methoxyphenoxazon 66 das 1-Chlor-2-hydroxy-4-methoxyphenoxazon 127 (Abb.109),

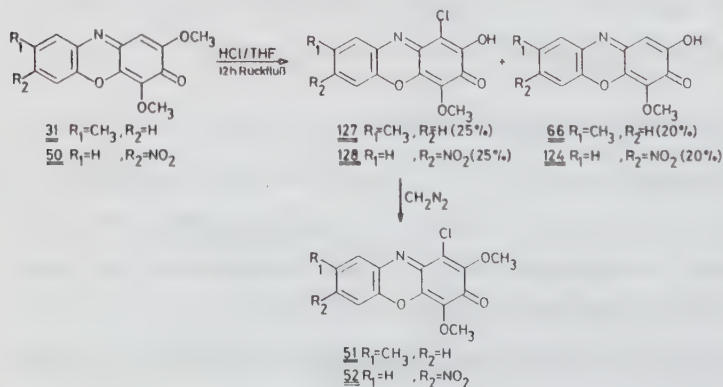


Abb.109: Darstellung von 51 und 52 aus 31 und 50

welches durch Reaktion mit Diazomethan in das 1-Chlor-2,4-dimethoxyphenoxazon 51 übergeht. In gleicher Weise konnten aus 50 die Verbindungen 128 und 52 dargestellt werden.

Auch bei der Umsetzung von Actinomycin C (vgl.S.155) mit wässriger Salzsäure hatte BROCKMANN bereits ein chloriertes Phenoxazon als Abbauprodukt gefunden^{130,142}.

51 zeigt im ¹H-NMR-Spektrum (Tab.9) die typische Lage und Multiplizität für die Protonen an C-6, C-7

CH ₃	2,43
OCH ₃	4.00 und 4.19
6-H	7.31 (d, 8Hz)
7-H	7.34 (dd, 8Hz und 2Hz)
9-H	7.69 (d, 2Hz)

und C-9, während das Signal für das 1-H fehlt: Das Chloratom ist demnach sowohl in 51 als auch in 127 in Position 1 angeordnet.

Tab.9: ¹H-NMR-Daten von 51
(360 MHz, FT, δ -Werte in ppm)

Eine direkte Chlorierung des
2-Hydroxy-4-methoxyphenoxazons 66

zu 127 gelang unter den angewendeten Reaktionsbedingungen (Abb.109) nicht. Andererseits war unter den Umsetzungsprodukten von 31 auch 51 nicht nachweisbar. Wir interpretieren diese Befunde so, daß 31 zunächst in einem langsamen Reaktionsschritt zu 51 chloriert wird, während in einem zweiten schnelleren Schritt - offenbar nun bedingt durch das zur Methoxygruppe an C-2 benachbarte Chloratom an C-1 - die Hydrolyse des Enolethers zu 127 sehr leicht erfolgt (vgl. dazu die gegenteilige Wirkung einer Methoxygruppe an C-1, S.143).

Die Bildung von 51 aus 31 wird bei Gegenwart von Chlor im Reaktionsgemisch verständlich, das durch Oxydation von HCl durch das Phenoxazon 31 entstanden sein könnte. Durch einen Additions(Cl₂)-Eliminierungs(HCl)-Mechanismus, wie er auch bei Enolethern beobachtet wird¹⁴³, kann dann

das Phenoxazon 51 gebildet werden. Ein ähnliches Reaktionsverhalten zeigt z.B. 2,6-Dimethoxy-1,4-benzochinon(25), welches unter Einwirkung von Brom in 3,5-Dibrom-2,6-dimethoxy-1,4-benzochinon(96) übergeht (vgl.S.127).

2.8.11. Darstellung von 2-Chlorphenoxazonen und deren Dehalogenierung

Im Zusammenhang mit dem Strukturbeweis für die Verbindungen 99 und 27 (Michigazon) wurde bereits Gebrauch von der literaturbekannten Reaktionsfolge gemacht, in der ein 2-Hydroxyphenoxazon durch Umsetzung mit Thionylchlorid und anschließende Hydrierung in zwei Stufen dehydroxyliert wird^{117,134)} (vgl.S.128f). Es bot sich an, diese Reaktionen zu nutzen, um weitere Phenoxazone für die massenspektrometrische Untersuchung darzustellen, die an C-2 entweder ein Chlor- oder ein Wasserstoffatom tragen. Unter anderem ist das 1,4-Dimethoxyphenoxazon 46 auf diesem Wege zugänglich (Abb.110):

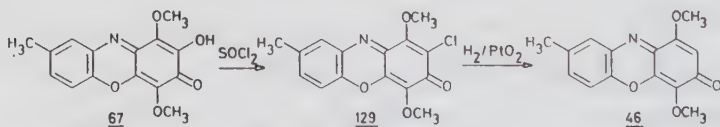
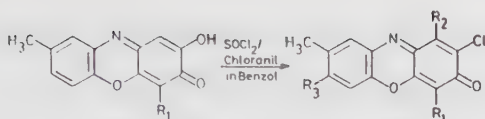


Abb.110: Darstellung von 46 aus 67

Darüberhinaus fanden wir, daß bei der Umsetzung von 66 mit Thionylchlorid in Abhängigkeit von der Reaktionszeit auch Chlor in die Positionen 1 und 7 des Phenoxazonringsystems eingeführt wird, so daß wir auf diesem Wege außer der erwarteten Monochlorverbindung 63 die beiden Dichlorphenoxazone 64 und 65 sowie die Trichlorverbindung 130 darstellen konnten (Abb.111).

Die ^1H -NMR-Daten von 64 gibt Tab.10 wieder. Während das 6-H, 7-H und 9-H aufgrund ihrer Lage und Multiplizität eindeutig zugeordnet werden können, fehlt das Signal für das Proton an C-1. Auch an der Struktur von



<u>66</u> $R_1 = OCH_3$	<u>63</u> $R_1 = OCH_3, R_2 = R_3 = H$	20% (4%)
	+ <u>64</u> $R_1 = OCH_3, R_2 = Cl, R_3 = H$	2.5% (11.5%)
	+ <u>65</u> $R_1 = OCH_3, R_2 = H, R_3 = Cl$	2.5% (10%)
	+ <u>130</u> $R_1 = OCH_3, R_2 = R_3 = Cl$	0% (7.5%)
<u>58</u> $R_1 = CH_3$	<u>131</u> $R_1 = CH_3, R_2 = R_3 = H$	21% (2%)
	+ <u>132</u> $R_1 = CH_3, R_2 = Cl, R_3 = H$	1.5% (8%)
	+ <u>133</u> $R_1 = CH_3, R_2 = H, R_3 = Cl$	3% (10%)
	+ <u>134</u> $R_1 = CH_3, R_2 = R_3 = Cl$	0% (8%)

Abb.111: Darstellung von 2-Chlorphenoxazonen aus 66 und 58

Ausbeuteangaben ohne Klammer: 10 Min.Rückfluß

mit Klammer: 30 Min.Rückfluß

CH_3	2.47
OCH_3	4.05
6-H	7.33 (d, 8Hz)
7-H	7.42 (dd, 8Hz und 2Hz)
9-H	7.73 (d, 2Hz)

Tab.10: 1H -NMR-Daten von 64
(180 MHz, FT, δ -Werte in ppm)

65 kann kein Zweifel bestehen:
nur im Falle des Vorliegens einer
2,7-Dichlor-Struktur ist das beob-
achtete Auftreten von drei Singulett
für die Ringprotonen verständlich.
Das Spektrum des Trichlorphenoxazons
130 weist - in Übereinstimmung mit

unserem Strukturvorschlag für diese Verbindung - zwei Singulett bei $\delta = 7,43$
und 7,75 ppm auf.

Die isomeren Dichlorphenoxazone besitzen ein sehr ähnliches chromatogra-
phisches Verhalten. Sie müssen entweder durch wiederholte präparative Dün-

schichtchromatographie oder mittels Gaschromatographie getrennt werden.

Setzt man anstelle des 2-Hydroxy-4-methoxyphenoxazons 66 die 2-Hydroxy-4-methylverbindung 58 ein, erhält man ein analoges Ergebnis (Abb.111).

Die für die Verbindungen 131-134 angegebenen Strukturen konnten ebenfalls durch $^1\text{H-NMR}$ -Spektren abgesichert werden.

Wir sehen den Grund für die Entstehung der höher chlorierten Phenoxazone im Ablauf von Substitutionsreaktionen, die auf die Bildung von Chlor im Reaktionsgemisch im Zuge einer Oxydation des bei der Reaktion freigesetzten Chlorwasserstoffs durch das Chloranil oder die Phenoxazone selbst zurückzuführen sind (vgl.S.145).

Die Monochlorphenoxazone 63 und 131 dienen uns als Ausgangsverbindungen zur Darstellung von 4-Methoxy-8-methylphenoxazon(30) und 4,8-Dimethylphenoxazon(55) (Abb.112):

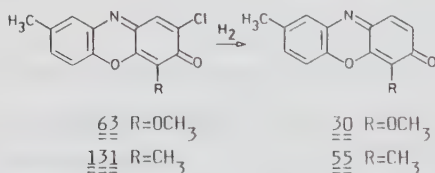


Abb.112: Darstellung von 30 und 55
(bezügl. der Reduktion zum
3-HO-phenoxazin vgl.S.128/129)

Wie wir fanden werden Phenoxazone, die an C-8 eine Hydroxymethylgruppe tragen, von Thionylchlorid in die entsprechende Chlormethylverbindung überführt (vgl.S.129). Die Reaktivität der Hydroxymethylgruppe unterscheidet sich unter den angewendeten Reaktionsbedingungen offenbar kaum von derjenigen der Hydroxygruppe an C-2: Auch nach kurzer Reaktionszeit

gelang die Isolierung einer Monochlorverbindung nicht, dagegen beobachteten wir aus 120 und 99 die ausschließliche Entstehung der Dichlorphenoxazone 135 und 102 (Abb.113), deren Strukturen durch $^1\text{H-NMR}$ - und Massenspektren gesichert sind.

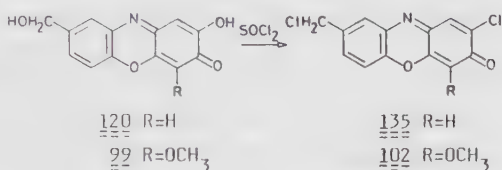


Abb.113: Darstellung von 135 und 102

Weiterhin stellte sich heraus, daß durch geeignete Wahl der Reaktions-temperatur bei der katalytischen Hydrierung dieser Dichlorphenoxazone das Chloratom der Chlormethylgruppe selektiv entfernt werden kann, ohne daß es gleichzeitig an C-2 zu einer Dehalogenierung kommt. Erst bei Anwendung höherer Temperaturen und längerer Reaktionszeiten erfolgt dann auch dort eine Umsetzung (Abb.114):

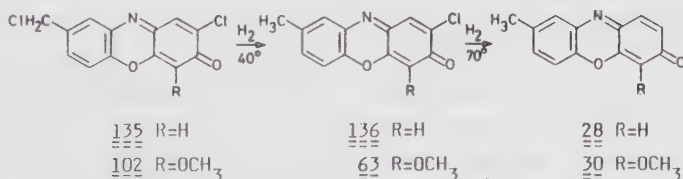


Abb.114: katalytische Hydrierung; stufenweise Dehalogenierung

Die Darstellung von 30 auf diesem Wege wurde bereits im Zusammenhang mit der Synthese von Michigazon(27) und dessen Strukturbeweis erwähnt (vgl.S.129).

2.8.12. Darstellung von 1,2-Dimethoxy-8-methylphenoxazon(47)

Nach der Synthese des 2,4-Dimethoxyphenoxazons 31 und des 1,4-Dimethoxyphenoxazons 46 lag uns daran, auch das noch fehlende 1,2-Dimethoxyphenoxazon 47 darzustellen, um die Massenspektren aller drei möglichen Isomeren (im Ring C) miteinander vergleichen zu können.

Durch KEHRMANN-Reaktion mit 2,5-Dihydroxy-3-methoxy-1,4-benzochinon(98) und anschließende Umsetzung mit Diazomethan sind 1,2-Dimethoxyphenoxazone - wie bereits dargelegt wurde (vgl.S.128) - nicht zugänglich, sondern ausschließlich die isomeren 2,4-Dimethoxyverbindungen. Wir griffen aus diesem Grunde auf das Verfahren der "Aminophenolxydation" zurück (vgl.S.122)^{117,123} und gingen nach dem in Abb.115 wiedergegebenen Synthesepan vor:

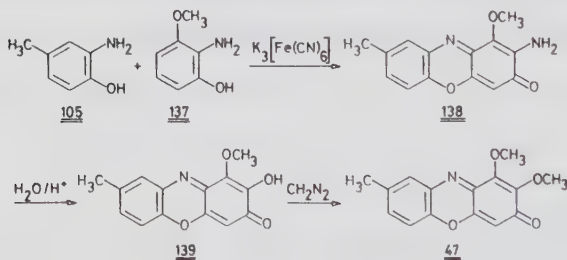


Abb.115: Darstellung des 1,2-Dimethoxyphenoxazons 47

Zur Synthese mußten die beiden Aminophenole 105 und 137 eingesetzt werden. 137 haben wir über 141¹⁴⁴) aus 2-Nitroresorcin(140) dargestellt (Abb.116):

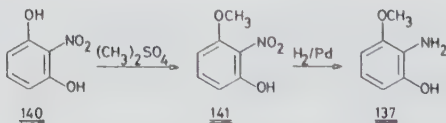
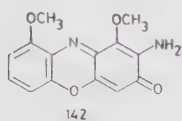


Abb.116: Darstellung von 137 aus 140
(Darstellung von 141 nach 144)

Setzt man zur Aminophenoloxydation - wie in unserem Falle - zwei verschiedene Aminophenole ein, muß allerdings mit der Entstehung von maximal vier unterschiedlich substituierten 2-Aminophenoxazonen gerechnet werden, falls jede der beiden Ausgangsverbindungen nicht nur mit der jeweils anderen, sondern auch mit sich selbst reagiert. Da das Aminophenol 105 jedoch an C-4 methylosubstituiert ist, kann dort eine Reaktion nicht mehr eintreten (vgl.S.123) und die Zahl der als Reaktionsprodukte möglichen 2-Aminophenoxazone vermindert sich auf maximal zwei: 105 kann mit 137



reagieren und 137 mit sich selbst. Beide 2-Aminophenoxazone - 138 und 142 - treten in der Tat als Produkte der Reaktion in etwa gleicher Menge auf (Ausbeute je ca. 10%). Beide Verbindungen sind

chromatographisch gut voneinander trennbar.

Setzt man 138 mit wässriger Essigsäure um (vgl.S.123)^{127,130}, erhält man - allerdings in sehr schlechter Ausbeute - das 2-Hydroxy-1-methoxyphenoxazon 139, das mit Diazomethan in die Zielverbindung 47 überführt werden konnte (Abb.115). Lage und Multiplizität der Signale im ¹H-NMR-Spektrum von 47 (Tab.11) bestätigen dessen Struktur.

CH ₃	2,43
OCH ₃	4,08 und 4,11
4-H	6,18
6-H	7,35 (d, 8Hz)
7-H	7,25 (dd, 8Hz und 2Hz)
9-H	7,66 (d, 2Hz)

Tab.11: ¹H-NMR-Daten von 47
(180 MHz, FT, δ -Werte in ppm)

2.8.13. Darstellung der Benzochinone 23, 24 und 26

Die Darstellung des größten Teiles der zur Synthese der Phenoxazone sowie für die MS(vgl.S.118)- und NMR(vgl.S.36)-Untersuchungen erforderlichen Benzochinone wurde bereits im Zusammenhang mit den Phenoxazonsynthesen beschrieben (vgl.S.127 u. 131-133). Darüberhinaus haben wir aus 69 und 98 durch Umsetzung mit Diazomethan die Chinone 24 und 26 sowie durch Oxydation von o-Anisidin(143)¹⁴⁵⁾ die Verbindung 23 dargestellt (Abb.117):

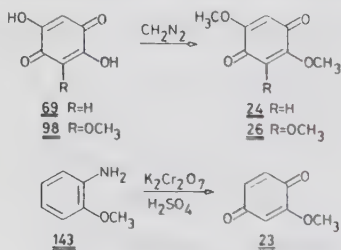
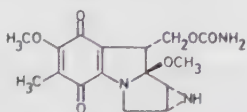


Abb.117: Darstellung von 23, 24 und 26

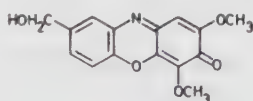
3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

3.1. Mitomycine und Phenoxazone; natürliches Vorkommen, chemische und biologische Eigenschaften

Ausgangsmaterial für unsere Untersuchungen war ein komplex zusammengesetztes Pigmentgemisch mit antibiotischer Wirkung, welches als Rohextrakt aus dem Streptomycesstamm Tü 1074* (*S. michiganensis*) erhalten worden war. Nach Ausarbeitung mehrstufiger chromatographischer Trennungsgänge konnten wir zwei Pigmente in mg-Mengen als Reinsubstanzen isolieren und ihre Strukturen durch eine Kombination spektroskopischer Untersuchungen mit Abbau- und Syntheseexperimenten aufklären. Es handelt sich um das violett gefärbte Mitomycin A (3) als Träger der antibiotischen Aktivität und um das bisher unbekannte - antibiotisch inaktive - 2,4-Dimethoxy-8-(hydroxymethyl)phenoxazon(27), dem wir den Namen Michigazon gegeben haben.



3 (absol. Konfig. ⁶⁹)



27

Die Mitomycine (vgl. Abb. 4, S. 21) weisen einige Strukturmerkmale auf, die für Stoffwechselprodukte eines Mikroorganismus ungewöhnlich sind: hierzu zählen der Aziridinring sowie das Pyrrolizinringsystem. Die im Zuge der Aufarbeitung der Fermentationsansätze beobachtete

* Stammsammlung Tübingen

extreme Instabilität von Mitomycin A erschwerte dessen Isolierung erheblich. Andere Autoren machten vergleichbare Beobachtungen beim Mitomycin C, das bei der Fermentation von Streptomyces kespitosus gebildet wird¹⁶⁹⁾. Angaben über die Ursachen dieser Instabilität sowie über die Art der Zersetzungsprodukte findet man in der Literatur jedoch nicht. Die Empfindlichkeit der Mitomycine erstaunt jedoch insofern nicht, als z.B. bekannt ist, daß sie bereits unter sehr milden Bedingungen unter Öffnung des Aziridinringes zu definierten Produkten hydrolysiert werden (Abb.118)¹⁷⁰⁾:

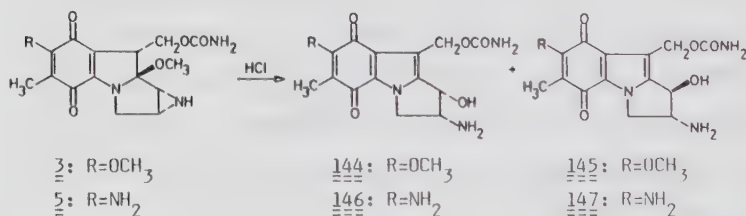
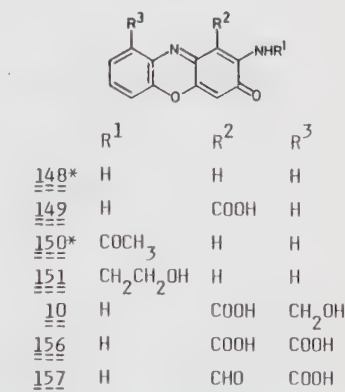
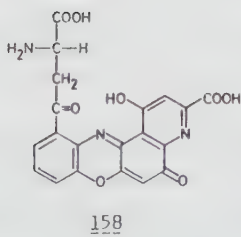
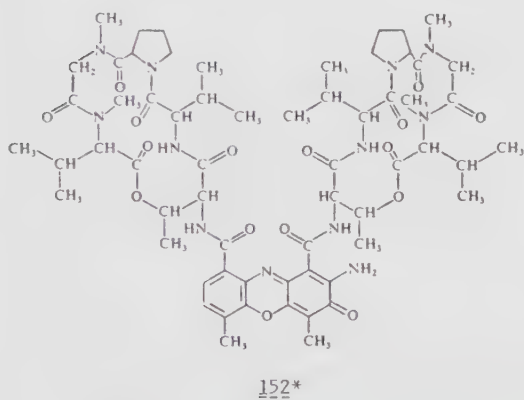


Abb.118: saure Hydrolyse von Mitomycin A (3) und Mitomycin C (5) zu den entsprechenden "apo-Mitomycinen" (144,146) und "iso-apo-Mitomycinen" (145,147) nach¹⁷⁰⁾.

Sowohl Mitomycine als auch Phenoxazone sind als Stoffwechselprodukte von Actinomyceten bekannt. Das Vorkommen von Vertretern beider Verbindungsklassen als Co-Metaboliten desselben Streptomyces-Stammes - wie wir es im Falle von S.michiganensis Tü 1074 gefunden haben - wurde dagegen bisher noch nicht beobachtet. Im Gegensatz zu den Mitomycinen, die bisher nur bei der Fermentation weniger Organismen aufgefunden wurden⁶⁸⁾ (vgl.S.21), sind die Phenoxazone weiter verbreitet. Neben weniger kompliziert gebauten Verbindungen wie 2-Aminophenoxazon (148, "Questionmycin A") aus Streptomyces fungicidicus¹⁴⁶⁾, 2-Amino-1-carboxy-

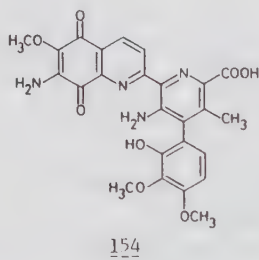
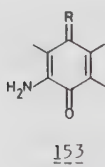
phenoxazon (149) aus *Nocardia*-Stämmen¹⁴⁷⁾, 2-Acetamidophenoxazon (150) aus *Waksmania aerata* sp. nov.¹⁴⁸⁾ und 2-(β -hydroxyethylamino)phenoxazon (151) aus *Streptomyces thioluteus*¹⁴⁹⁾ isoliert man aus verschiedenen *Streptomyces*-Stämmen die komplizierter gebauten Actinomycine (z.B. Actinomycin D (152))¹²⁶⁾ (Abb.119). Die bekannten natürlichen Phenoxazone besitzen eine Aminofunktion an C-2. Dies gilt insbesondere für diejenigen mit antibiotischer Wirksamkeit^{126,146,148)}. Das Fehlen einer Aminofunktion an C-2 von Michigazon steht daher im Einklang mit seiner antibiotischen Inaktivität.



	R ¹	R ²	R ³
<u>148</u> *	H	H	H
<u>149</u>	H	COOH	H
<u>150</u> *	COCH ₃	H	H
<u>151</u>	CH ₂ CH ₂ OH	H	H
<u>10</u>	H	COOH	CH ₂ OH
<u>156</u>	H	COOH	COOH
<u>157</u>	H	CHO	COOH

Abb.119: natürlich vorkommende (bzw. aus natürlichem Material gewonnene) Phenoxazone (*: antibiotische Aktivität beschrieben)

Zwischen Mitomycinen einerseits und biologisch aktiven Phenoxazonen andererseits bestehen Parallelen hinsichtlich spezieller Wirkungen und der damit verbundenen Wirkungsmechanismen: Mitomycin C und Actinomycin D zeigen z.B. neben ihrer antibakteriellen auch eine ausgeprägt cytostatische Aktivität und haben daher Eingang in die Therapie gefunden¹⁶²⁾. Für die cytostatische Wirksamkeit ist das Vorliegen des gemeinsamen Strukturelementes 153 verantwortlich gemacht worden¹⁶³⁾, das u.a. auch im gleichfalls krebshemmenden Streptonigrin (154) aus Streptomyces flocculus¹⁶⁴⁾ auftritt.



Wie biochemische Untersuchungen gezeigt haben, beziehen alle drei genannten Antibiotika ihre Wirksamkeit aus einer Wechselwirkung bzw. Komplexbildung mit der DNS: Während Mitomycin C und Streptonigrin die DNS-abhängige DNS-Synthese (Replikation) hemmen^{166,167)}, greift Actinomycin D in die DNS-abhängige RNS-Synthese (Transkription) ein¹⁶⁸⁾. Weitere Vertreter natürlich vorkommender Phenoxazone (vgl. Abb. 119) sind die Pilzfarbstoffe Cinnabarin (10)¹⁵⁰⁾, Cinnabarinssäure (156)¹⁵¹⁾ und Iramessanguin (157)¹⁵²⁾ aus Polyporus cinnabarinus sowie unsubstituiertes Phenoxazon (7) aus Calocybe gambosa¹⁵³⁾. 7 zeichnet sich durch tuberculostatische Wirksamkeit aus¹⁶⁵⁾. Das zur Gruppe der sog. Ommochrome

gehörende Xanthommatin (158) wurde als Pigment aus Insektenaugen isoliert^{154,156b}). Dieser Substanz wird eine Funktion beim Sehvorgang zugeschrieben. Durch Behandlung gewisser Flechten mit Sauerstoff und wässrigem Ammoniak fallen die Orcein-Farbstoffe (z.B. α -Aminoorcein (159)) an¹⁵⁵).

3.2. Biogenetische Aspekte

Für die Biogenese von Mitomycinen und Phenoxazonen werden in der Literatur völlig verschiedene Wege diskutiert. Bei den Mitomycinen diskutiert HORNE-MANN auf der Basis von Tracerexperimenten den Aufbau des Ringsystems aus einer C_6N - und einer C_7N -Einheit, die zuvor aus D-Glucose und D-Glucosamin als Vorstufen gebildet werden (Abb.120)^{160,161}).

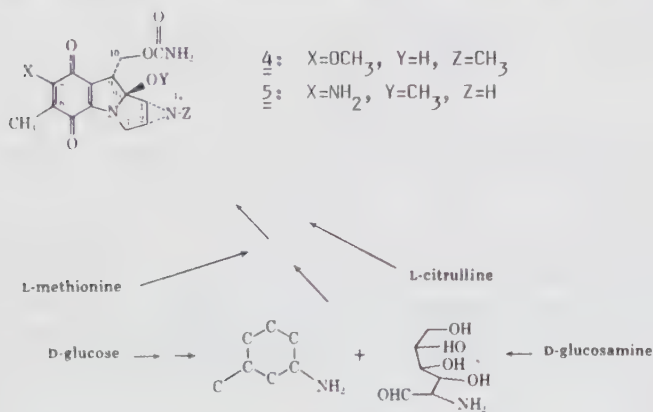


Abb.120: Biogenese von Mitomycinen nach¹⁶⁰⁾

Für die bekannten Phenoxazone aus Mikroorganismen ist neben einer Aminofunktion an C-2 die C-Substitution in den Positionen 1 und 9 (im Falle der Actinomycine auch in den Positionen 4 und 6) typisch. Aus biogene-

tischer Sicht diskutiert man aufgrund dieser Strukturcharakteristika und gestützt auf den Einsatz radioaktiv markierter Vorstufen eine Bildung des Phenoxazon-Chromophors durch oxydative Kopplung von zwei o-Aminophenol-Einheiten aus dem Tryptophan-Stoffwechsel¹⁵⁶⁻¹⁵⁸). Ein starker Anhaltspunkt für diese Hypothese ist auch in dem gleichzeitigen Vorkommen von o-Aminophenol ("Questiomycin B") und 2-Aminophenoxazon (148, "Questiomycin A") in den Fermentationsansätzen einzelner Streptomyces-Stämme zu sehen¹⁵⁹). Bei den Actinomycinen konnte als Quelle für die beiden Methylgruppen an C-4 und C-6 durch Tracerexperimente Methionin nachgewiesen werden¹⁵⁷).

Michigazon läßt sich allerdings in dieses Schema nicht ohne weiteres einordnen; Zwar ist die Erhöhung der Ausbeute an Michigazon bei der Fermentation von S.michiganensis Tü 1074 durch Steigerung der Luftzufuhr (vgl.S. 13) mit der biogenetischen Hypothese für Phenoxazone, die das Vorliegen oxydierender Bedingungen erfordert, im Einklang; ungewöhnlich ist jedoch die 2-Methoxy- und die 8-C-Substitution. Auf dieser Basis erscheint daher das Vorkommen von Michigazon neben Mitomycin A als Co-Metabolit desselben Streptomyces-Stammes aus biogenetischer Sicht interessant: HORNEMANN hat darauf hingewiesen, daß beide Verbindungen C₇N-Untereinheiten aufweisen (Abb.121)¹⁸⁰), die

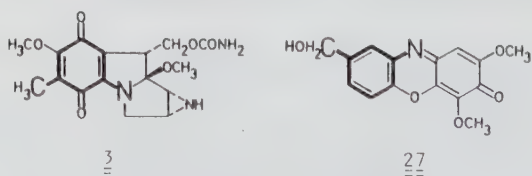


Abb.121: C₇N-Untereinheiten in Mitomycin A (3) und Michigazon (27): biogenetisch relevante Übereinstimmung?

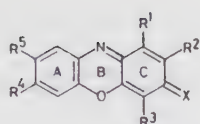
auf eine mögliche - nach den bisherigen Untersuchungen an Mitomycinen und Phenoxazonen unerwartete - biogenetische Verwandtschaft zwischen beiden Verbindungen hindeuten könnte. Studien zur Biogenese von Michigazon sollen daher in nächster Zeit in Angriff genommen werden¹⁸⁰⁾.

3.3. Synthetische Aspekte

Während die Synthese von Mitomycinen eine - von Teilerfolgen abgesehen¹⁷³⁾ - bisher ungelöste Aufgabe darstellt, sind für den präparativen Zugang zu Phenoxazonen verschiedene gut ausgearbeitete Verfahren beschrieben¹¹⁷⁻¹²⁴⁾. Viele natürlich vorkommenden Phenoxazone wurden durch "Aminophenoloxydation" dargestellt (vgl.S.122), so z.B. Xanthommatin (158)¹⁷⁴⁾, Cinnabarin (10)^{147,175)} sowie mehrere Actinomycine^{126,176)} (vgl.Abb.119,S.155). Vergleicht man dieses letztgenannte Verfahren mit den Vorstellungen zur Biogenese der Phenoxazone, so liegt hier eine biomimetische Synthese vor¹⁷⁷⁾.

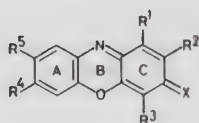
Für die massenspektrometrische Untersuchung war die gezielte Darstellung einer größeren Anzahl von Phenoxazonen - darunter zahlreiche isotope-markierte Substanzen - erforderlich. Zum Aufbau des Phenoxazonring-systems der von uns benötigten - bis auf wenige Ausnahmen bisher nicht beschriebenen - Verbindungen haben wir das Prinzip der "KEHRMANN-Reaktion" (vgl.S.123) mit Erfolg angewendet. Der Vorteil bestand hierbei darin, daß die anfallenden Hydroxyphenoxazone durch einfache Umsetzungen (z.B. Alkylierung, Hydrierung, Reaktion mit Thionylchlorid etc.) für unseren Bedarf optimal chemisch modifiziert werden konnten. Tab.12 faßt alle von uns dargestellten Phenoxazone, zu denen auch das Michigazon gehört, zusammen:

Tab.12: Zusammenfassung der dargestellten Phenoxazone
Literaturbekannte Verbindungen sind gekennzeichnet (*)



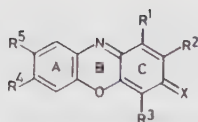
Nr.	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	X	MS Seite	exp. Teil Seite
38	H	OCH ₃	OCH ₃	H	H	O	57	209
38a	H	OCH ₃	OCH ₃	H	H	¹⁸ O	59	215
38b	H	¹⁸ OCH ₃	OCH ₃	H	H	O	60	216
38c	H	¹⁸ OCH ₃	OCH ₃	H	H	¹⁸ O	---	216
39	H	OCH ₃	OCH ₃	H	CH ₂ OAc	O	57	202
46	OCH ₃	H	OCH ₃	H	CH ₃	O	74	220
47	OCH ₃	OCH ₃	H	H	CH ₃	O	74	225
49	H	OCH ₃	OCH ₃	H	NO ₂	O	---	211
50	H	OCH ₃	OCH ₃	NO ₂	H	O	79	211
51	Cl	OCH ₃	OCH ₃	H	CH ₃	O	81	219
52	Cl	OCH ₃	OCH ₃	NO ₂	H	O	82	220
53	H	OC ₂ H ₅	OCH ₃	H	CH ₃	O	84	210
53a	H	OC ₂ H ₅	OCD ₃	H	CH ₃	O	84	214
54	H	OCH ₃	OC ₂ H ₅	H	CH ₃	O	88	213
54a	H	OCD ₃	OC ₂ H ₅	H	CH ₃	O	88	214
55	H	H	CH ₃	H	CH ₃	O	95	223
56*	H	OH	H	H	CH ₃	O	96	205
56a	H	¹⁸ OH	H	H	CH ₃	¹⁸ O	---	217
57	H	OH	OH	H	CH ₃	O	96	212
57a	H	¹⁸ OH	¹⁸ OH	H	CH ₃	¹⁸ O	---	216

Tab. 12



Nr.	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	X	MS Seite	exp. Teil Seite
58	H	OH	CH ₃	H	CH ₃	O	98	207
59	H	OH	C ₂ H ₅	H	CH ₃	O	98	207
60	H	OCH ₃	CH ₃	H	CH ₃	O	100	207
61	H	OCH ₃	C ₂ H ₅	H	CH ₃	O	100	207
61a	H	OCDC ₃	C ₂ H ₅	H	CH ₃	O	100	208
62	H	OCH ₃	OH	H	CH ₃	O	103	212
62a	H	OCDC ₃	OH	H	CH ₃	O	103	213
63	H	Cl	OCH ₃	H	CH ₃	O	107	203/220
64	Cl	Cl	OCH ₃	H	CH ₃	O	107	220
65	H	Cl	OCH ₃	Cl	CH ₃	O	107	220
66	H	OH	OCH ₃	H	CH ₃	O	109	209
66a	H	¹⁸ OH	OCH ₃	H	CH ₃	¹⁸ O	109	215
66b	H	OD	OCH ₃	H	CH ₃	O	110	214
66c	D	OD	OCH ₃	H	CH ₃	O	110	214
66d	H	OH	¹⁸ OCH ₃	H	CH ₃	O	---	217
67	OCH ₃	OH	OCH ₃	H	CH ₃	O	112	208
67a	OCH ₃	OD	OCH ₃	H	CH ₃	O	112	215
68	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H	CH ₃	O	115	208
68a	OCH ₃	OCDC ₃	OCH ₃	H	CH ₃	O	115	208
68b	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H	CH ₃	¹⁸ O	115	218
99	H	OH	OCH ₃	H	CH ₂ OH	O	---	202

Tab. 12

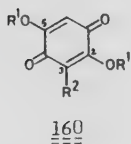


Nr.	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	X	MS Seite	exp. Teil Seite
102	H	Cl	OCH ₃	H	CH ₂ Cl	O	---	202
119*	H	OH	H	H	H	O	---	204
120	H	OH	H	H	CH ₂ OH	O	---	205
121	H	OCH ₃	H	H	CH ₂ OH	O	---	206
122	H	OH	OCH ₃	H	H	O	---	208
122a	H	¹⁸ OH	OCH ₃	H	H	¹⁸ O	---	215
123	H	OH	OCH ₃	H	NO ₂	O	---	210
124	H	OH	OCH ₃	NO ₂	H	O	---	211
125	H	OC ₂ H ₅	OH	H	CH ₃	O	---	214
126	H	OH	OC ₂ H ₅	H	CH ₃	O	---	218
127	Cl	OH	OCH ₃	H	CH ₃	O	---	219
128	Cl	OH	OCH ₃	NO ₂	H	O	---	219
129	OCH ₃	Cl	OCH ₃	H	CH ₃	O	---	220
130	Cl	Cl	OCH ₃	Cl	CH ₃	O	---	220
131	H	Cl	CH ₃	H	CH ₃	O	---	222
132	Cl	Cl	CH ₃	H	CH ₃	O	---	222
133	H	Cl	CH ₃	Cl	CH ₃	O	---	222
134	Cl	Cl	CH ₃	Cl	CH ₃	O	---	222
135	H	Cl	H	H	CH ₂ Cl	O	---	223
136	H	Cl	H	H	CH ₃	O	---	223
139	OCH ₃	OH	H	H	CH ₃	O	---	225

Tab. 12

Die Diskussion der mechanistischen Aspekte der durchgeführten Umsetzungen erfolgte im einzelnen bereits im Allgemeinen Teil. Auf einige wesentliche Punkte soll an dieser Stelle nochmals eingegangen werden, da sie von prinzipiellem Interesse sind:

Die "KEHRMANN-Reaktion" führt im allgemeinen dann zur Bildung eines einheitlichen, an C-2 hydroxysubstituierten Phenoxazons, wenn die Amino-



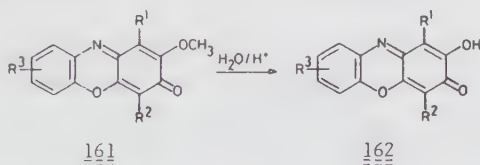
phenolkomponente mit einem 2,5-Dihydroxy(bzw.-Di-alkoxy)benzochinon umgesetzt wird (160, $R^1=H$ bzw. Alkyl, vgl. Abb. 91, S. 124: Reaktionsweg C) ¹²⁴⁾.

Die Anordnung der Substituenten im Ring C des entstehenden Phenoxazons wird im Primärschritt der Reaktion terminiert, in welchem eine nucleophile Substitution einer der beiden OH-(OR-)Gruppen an C-2 oder C-5 des Benzochinons durch die Aminogruppe des eingesetzten Aminophenols erfolgt ¹²⁵⁾. Erwartungsgemäß erfolgt eine Substitution bevorzugt an C-2, falls R^2 ein elektronenziehender Substituent ist ^{124,129)}, dagegen an C-5, wenn R^2 ein elektronenliefernder Substituent ist ¹³⁰⁾.

Bei Chinonen vom Typ 160, in denen $R^2=OH$ oder OAlkyl ist, muß darüber hinaus mit dem Ablauf einer Reaktion an C-3 gerechnet werden (vgl. Abb. 91, S. 124: Reaktionsweg A). Der Einsatz derartig substituierter Chinone, der für die Darstellung unserer Zielverbindungen erforderlich war, ist bisher nicht beschrieben worden. Bei der Umsetzung der Chinone 98 ($R^1=H$, $R^2=OCH_3$) und 70 ($R^1=CH_3$, $R^2=OH$) fanden wir jedoch keine Produkte einer Reaktion an C-3, sondern isolierten jeweils ausschließlich das Produkt, welches durch Umsetzung an C-5 des Chinons zustande kommt. Die KEHRMANN-Reaktion kann daher zur gezielten Darstellung bisher nicht beschriebener

2,4-Dihydroxy- und 2-Hydroxy-4-alkoxyphenoxazone verwendet werden. Ein Zugang zu weiteren neuen Phenoxazonen ist durch den Einsatz von 2,5-Dihydroxy-3,6-dialkoxybenzochinonen möglich, die bevorzugt an C-2 (in diesem Falle äquivalent mit C-5) reagieren: Das Auftreten des Reaktionsproduktes einer Umsetzung an C-3 wurde - obwohl die Reaktivität in dieser Position vergleichbar sein sollte (Reaktionsweg C, s.o.) - nicht beobachtet.

Die saure Hydrolyse von 2-Aminophenoxazonen zu 2-Hydroxyphenoxazonen ist beschrieben, erfordert jedoch recht drastische Reaktionsbedingungen^{127,130}. Wir fanden, daß sich ein 2-Methoxyphenoxazon in saurem Milieu sehr leicht zur entsprechenden 2-Hydroxyverbindung umsetzen läßt (vgl.S.141/142). Unsere Experimente sprechen weiterhin dafür, daß diese Reaktion auch bei 2,4-Dimethoxyphenoxazonen sehr leicht eintritt, welche zusätzlich an C-1 halogensubstituiert sind (z.B. $R^1=Cl$, $R^2=OCH_3$ in 161):



2,4-Dimethoxyphenoxazone ($R^1=H$, $R^2=OCH_3$) reagieren ebenfalls, wobei allerdings längere Reaktionszeiten erforderlich sind (vgl.S.139). 1,2,4-Trimethoxyphenoxazone ($R^1=R^2=OCH_3$) konnten unter den angewendeten Reaktionsbedingungen (vgl.S.218) nicht umgesetzt werden.

Wir sehen diese Umsetzung als nucleophile Substitutionsreaktion; vergleichbare Reaktionen sind am C-Atom 2 von 2-Acetoxyphenoxazonen

beobachtet worden¹⁷⁸⁾. Ähnlich dem Angriff der Aminofunktion eines o-Aminophenols auf die Benzochinonkomponente im Primärschritt der KEHRMANN-Reaktion sollten auch im hier vorliegenden Falle elektronenliefernde Substituenten am Ring C des Phenoxazonringsystems die Umsetzung erschweren (und zwar Substituenten in Position 1 stärker als solche in Position 4), während sie durch elektronenziehende Substituenten (z.B. Cl an C-1) erleichtert werden sollte. Die beobachtete Abstufung der Reaktivität einer Methoxygruppe an C-2 der von uns untersuchten Phenoxazone entspricht daher voll der Erwartung. Auch die Resistenz der Methoxygruppe an C-4 von 2,4-Dimethoxyphenoxazonen sowie aller Methoxygruppen von 1,2,4-Trimethoxyphenoxazonen paßt aus elektronischen Gründen in dieses Bild.

Das geschilderte Reaktionsverhalten kann zur gezielten Synthese spezifisch isotopenmarkierter Phenoxazone genutzt werden, deren Darstellung andernfalls auf erheblich aufwendigere Art erfolgen müßte: Über die spezifische ^{18}O -Markierung der Carbonylgruppe hinaus - diese ist für Benzophenoxazone beschrieben¹³⁹⁾ - gelingt durch Hydrolysereaktionen unter Verwendung von H_2^{18}O in Kombination mit Alkylierungsschritten die Synthese weiterer selektiv ^{18}O -markierter Phenoxazone (vgl.S.138ff). U.a. wird auf diesem Wege die ^{18}O -Markierung der Methoxygruppen von 2,4-Dimethoxyphenoxazonen möglich. Im allgemeinen sind zur ^{18}O -Markierung von Alkohol- und Ethersauerstoffatomen mehrstufige Synthesen erforderlich, wie z.B. zur Darstellung von ^{18}O -Benzylalkohol¹⁷⁹⁾ oder von ^{18}O -markierten Phenoxybenztroponen⁴²⁾.

3.4. Aspekte der Massenspektrometrie von Phenoxazonen

3.4.1. Einfluß verschiedener Substituenten auf das Fragmentierungsverhalten

Neben dem Spektrum von Michigazon (27) haben wir die Massenspektren von mehr als 50 geeigneten Phenoxazonen - darunter zahlreiche isotonenmarkierte Verbindungen - aufgenommen und interpretiert, um Einblick in die MS-Fragmentierung dieser Substanzklasse zu erhalten (vgl.Tab.12). Die Erstellung von Fragmentierungsschemata sowie die ins Detail gehende Diskussion der Hauptfragmentierungsreaktionen und deren Abhängigkeit von bestimmten Strukturparametern erfolgte bereits im Allgemeinen Teil. Einige wesentliche Gesichtspunkte verdienen eine zusammenfassende Darstellung:

Im Zuge des MS-Zerfalles der untersuchten Phenoxazone werden bevorzugt der Ring C sowie die an diesem befindlichen Substituenten abgebaut. Dieser Befund war aufgrund der bereits publizierten Ergebnisse für das unsubstituierte Phenoxazon⁵⁰⁾ und das 2-Aminophenoxazon⁵¹⁾ zu erwarten.

Im Massenspektrum von unsubstituiertem Phenoxazon dominiert - im Hinblick auf das chinoide System erwartungsgemäß⁸³⁾ - die Abspaltung von Kohlenmonoxid aus dem Molekülion. Die Unterdrückung dieses Prozesses zugunsten spezifischer anderer Fragmentierungsreaktionen wird vor allem durch die Substituenten OH, OCH₃, OC₂H₅, CH₃ oder C₂H₅ im Ring C verursacht. Dabei sind zwei Phänomene von besonderem analytischem Interesse:

1. das Auftreten interessanter neuer Umlagerungsreaktionen, deren Ablauf eine bestimmte Anordnung funktioneller Gruppen zueinander voraussetzt,

2. das alternative Auftreten verschiedener Fragmentierungsreaktionen im Bereich eines Substituenten in Abhängigkeit von dessen Position am Ring C.

Die Substituenten am Ring A (vgl.Tab.12: R⁵ bzw. R⁶) beeinflussen dagegen - unabhängig von deren Art - das Fragmentierungsverhalten nur unwesentlich. Selbst eine zusätzliche Nitrogruppe, die sonst Anlaß zu ausgeprägten Konkurrenzfragmentierungen gibt (vgl.S.77/79)^{52,59,100-102}, führt lediglich zu Intensitätsänderungen bei einzelnen Fragmenten, die mit dem Vorliegen eines elektronischen Substituenteneffektes¹⁰³ erklärt werden können. Die gleiche Feststellung läßt sich für die von uns untersuchten Chlorphenoxazone (Substitution in den Positionen 1,2 und 7) treffen.

3.4.2. Interessante neue Umlagerungsreaktionen

Wir beobachteten drei charakteristische Zerfallsreaktionen, deren Auftreten aufgrund der Strukturparameter der untersuchten Phenoxazone überrascht und die zur Bildung der intensivsten Fragmenten in den jeweiligen Massenspektren führen:

1. die sehr starke Abspaltung eines CHO-Radikals aus den Molekülonen von 2-Methoxyphenoxazonen,
2. die ausgeprägte Wasserabspaltung aus den Molekülonen von 2,4-Dimethoxyphenoxazonen und
3. die signifikante Abspaltung von H₂CO₂ aus den Molekülonen von 2-Hydroxy-4-methoxy- sowie 4-Hydroxy-2-methoxyphenoxazonen.

Diesen Fragmentierungsprozessen müssen Umlagerungen der Molekülonen vorausgehen, wobei der Nachbarständigkeit der Carbonylgruppe zu den

Substituenten an C-2 und C-4 eine entscheidende Rolle zuzuordnen ist. Die spektroskopischen Daten der von uns untersuchten isotopenmarkierten Verbindungen rechtfertigen die Diskussion einer gemeinsamen mechanistischen Basis für die Umlagerung der Molekülionen von 2-Methoxy-, 2,4-Dimethoxy- und 4-Hydroxy-2-methoxyphenoxazonen (Abb.122, vgl.S. 49,67 und 105). Aus den Strukturen M_c^+ bzw. M_d^+ läßt sich in Abhängigkeit von der Art des Substituenten R an C-4 alternativ die Eliminierung von CHO, HCOOH oder (nach weiterer Umlagerung, vgl.S.67) H_2O rationalisieren. (Bezüglich der mechanistischen "Symmetrie" zwischen 4-Hydroxy-2-methoxyphenoxazonen und den 2-Hydroxy-4-methoxy-Isomeren vgl. S.108/109.)

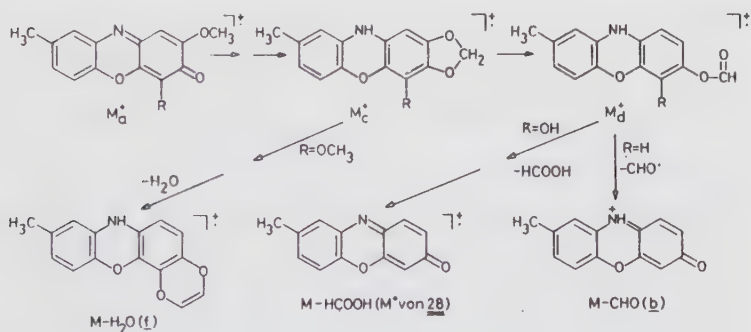


Abb.122: Gemeinsame mechanistische Grundlage (Vorschlag) für den Ablauf der Hauptfragmentierungsreaktionen in den Spektren von 2-Methoxyphenoxazonen ($R=H$), 2,4-Dimethoxyphenoxazonen ($R=OCH_3$) und 4-Hydroxy-2-methoxyphenoxazonen ($R=OH$)

Abspaltung eines CHO-Radikals

Durch den Einsatz isotoopenmarkierter Verbindungen konnten wir zeigen, daß alle Atome des eliminierten Teilchens der Methoxygruppe an C-2 entstammen. Die Carbonylgruppe ist also - entgegen der ursprünglichen Annahme (vgl.S.44) - nicht Bestandteil der abgespaltenen Elementkombination. Die signifikante Abspaltung eines CHO-Radikals aus einer Methoxygruppe ist bei aromatischen Methylethern zwar in seltenen Fällen schon beobachtet worden⁹¹⁾; die Intensität des entsprechenden Fragmentions im Spektrum des 2-Methoxyphenoxazons 29 (vgl.S.43, Fragment b =base peak) ist jedoch äußerst ungewöhnlich. Der von uns vorgeschlagene Fragmentierungsmechanismus bietet hier eine Erklärungsmöglichkeit.

Abspaltung von H₂O

Durch Isotoopenmarkierungsexperimente konnten wir beweisen, daß das Sauerstoffatom der Methoxygruppe an C-2 und je eines der Wasserstoffatome beider Methoxygruppen (an C-2 und C-4) Bestandteile des abgespaltenen Wassermoleküls sind. Der einstufige Verlauf dieses Prozesses wird durch ein intensives metastabiles Signal angezeigt. Wasserabspaltungen (oder Abspaltungen eines OH-Radikals) unter Beteiligung von Sauerstoffatomen in Etherbindung sind äußerst selten beobachtete Fragmentierungsprozesse, die darüberhinaus zu Fragmentionen von geringer Intensität führen^{42,97)}. Zum Auftreten eines derart intensiven Fragmentes M-H₂O wie bei den 2,4-Dimethoxyphenoxazonen gibt es in der Literatur keinen Parallelfall.

das Vorliegen einer 2,4-Dimethoxystruktur ist offensichtlich Voraussetzung für diese ungewöhnliche MS-Fragmentierungsreaktion. Dieser Beobachtung wird durch den von uns vorgeschlagenen Mechanismus (vgl.

S.67) Rechnung getragen. Weiterhin vermag er zu erklären, daß ein signifikantes Fragment $M-H_2O$ - wenn auch nicht als intensivstes Fragment - darüberhinaus in den Spektren von

1. 2-Ethoxy-4-methoxyphenoxazonen und

2. 4-Ethyl-2-methoxyphenoxazonen

auftritt.

Wie wir fanden, tritt eine Wasserabspaltung aus dem Molekülion auch beim MS-Zerfall des 4-Methoxyphenoxazons 30 auf. Wir haben den Nachweis erbracht, daß hierbei das Sauerstoffatom der Carbonylfunktion in das eliminierte Teilchen eingebaut wird, also ein anderer Fragmentierungsmechanismus als der oben genannte wirksam wird. Die Intensität des Fragmentions ist jedoch minimal; trotzdem lohnt sich eine Erwähnung dieses Prozesses, da eine Abspaltung von Wasser unter Einbau eines Ketosauerstoffatoms in die eliminierte Partikel im allgemeinen ebenfalls selten beobachtet wird⁹²⁻⁹⁴).

Als weiteres Beispiel einer ungewöhnlichen Wasserabspaltung kann der erst kürzlich publizierte MS-Zerfall des Diesters 163 zitiert werden¹⁷¹). Gestützt auf Isotopenmarkierungsexperimente diskutieren die Autoren den in Abb.123 wiedergegebenen Fragmentierungsmechanismus für die Bildung des Fragmentes $M-H_2O$ im Massenspektrum dieser Verbindung. Wie im Falle des von uns vorgeschlagenen Mechanismus für den Zerfall der 2,4-Dimethoxyphenoxazone wird auch hier zunächst eine mehrstufige Umlagerung auf der Stufe des Molekülions formuliert, um die Wasserabspaltung rationalisieren zu können:

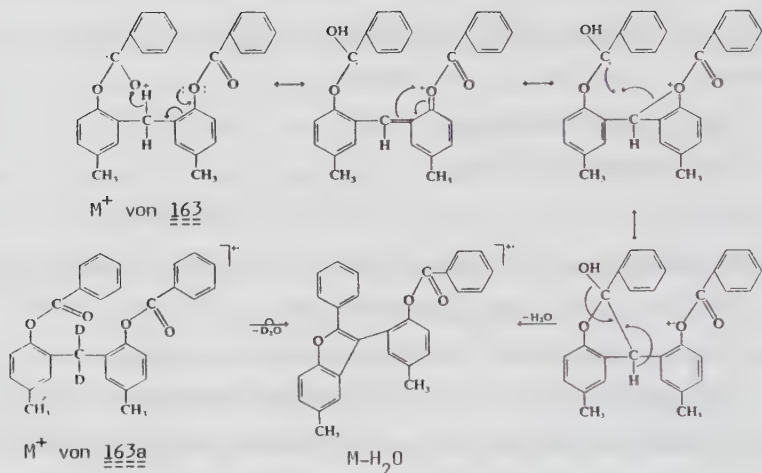


Abb.123: Mechanismus der Wasserabspaltung aus dem Molekül
des Diesters 163 nach¹⁷¹⁾

Abspaltung von HCOOH

Die Bildung eines Fragmentes $M-H_2CO_2$ (46ME) ist als zweistufiger Prozeß (H_2O+CO) oder als einstufiger Prozeß interpretierbar. Für den MS-Zerfall des 2-Methoxyphenoxazons 29 und des 4-Methoxyphenoxazons 30 (hier war dieses Fragment jedoch nur von relativ geringer Intensität) konnten wir einen zweistufigen Ablauf der Genese nachweisen. Im Falle der 4-Hydroxy-2-methoxy-Verbindung 62 und des 2-Hydroxy-4-methoxy-Isomeren 66 ließen sich dagegen Argumente für eine einstufige Bildung des Fragmentions ableiten, wobei gezeigt werden konnte, daß die Herkunft der in das abgespaltene Molekül eingebauten Wasserstoffatome gegenüber dem o.g. Zweistufenprozeß verschieden ist.

Der von uns vorgeschlagene Fragmentierungsmechanismus bedarf jedoch

noch weiterer Absicherung, da die in das eliminierte Teilchen inkorporierten Sauerstoffatome sowie das Kohlenstoffatom bisher nicht zweifelsfrei identifiziert sind. Sollte sich der von uns vorgeschlagene Reaktionsablauf erhärten lassen, wäre ein weiterer sehr ungewöhnlicher Fragmentierungsschritt aufgefunden, für den in der Literatur kein vergleichbarer Fall existiert.

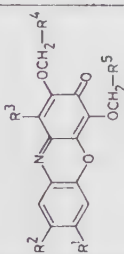
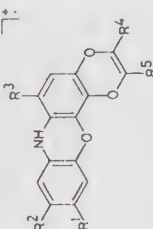
3.4.3. Strukturanalytischer Informationsgehalt der Massenspektren von Phenoxazonen

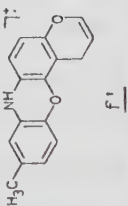
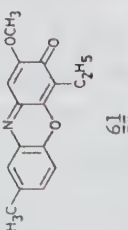
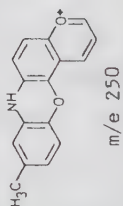
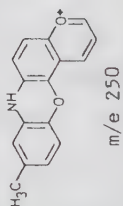
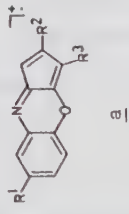
Die MS-Fragmentierung eines organischen Moleküls kann sowohl Aufschluß über die vorliegende Substanzklasse (Grundgerüst) als auch über die Art der Substitution eines Grundgerüsts geben. Flavone zeichnen sich z.B. durch einen ausgeprägten Dien-Zerfall des Grundgerüsts aus, dessen Folge das Auftreten zweier charakteristischer Fragmente im Massenspektrum ist, die die jeweilige Molekülhälfte repräsentieren¹⁷²). Eine derartige charakteristische Abbaureaktion des Grundgerüsts findet man in den Spektren der untersuchten Phenoxazone nicht. Die Information, ob man es bei einer unbekannten Substanz mit einem Phenoxazon zu tun hat, kann daher dem Massenspektrum nicht entnommen werden.

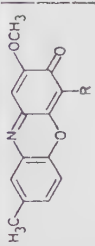
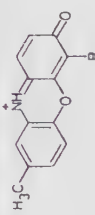
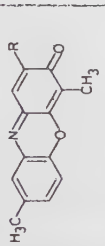
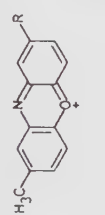
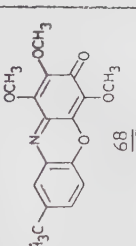
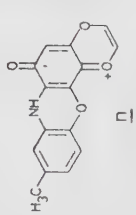
Ist man aber aufgrund weiterer spektroskopischer Befunde (UV,IR) sicher, daß ein Phenoxazon vorliegt, erlaubt die Analyse des MS-Zerfalles dem Analytiker weitgehende Aussagen über Art, Anzahl und Position der Substituenten am Ring C. Das Wesentliche dieser Korrelationen ist - sozusagen als "Arbeitsschablone" zur Analyse des Spektrums eines unbekannten Phenoxazons - in Tab.13 zusammengefaßt. Das Massenspektrum stellt hier eine optimale Ergänzung zur ¹H-NMR-Spektroskopie dar, mittels derer allein die eindeutige Strukturfestlegung gerade bei höher substituierten Phenoxazonen problematisch ist (siehe Michigazon).

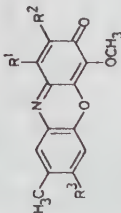
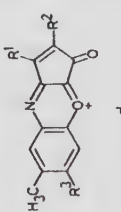
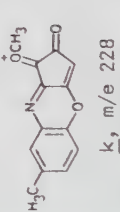
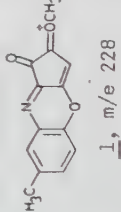
Die Fragmentierungsreaktionen lassen sich einteilen in solche Prozesse, die charakteristisch für die Gesamtsubstitution im Ring C sind und andere, die Rückschlüsse auf Art und Position einzelner Substituenten erlauben: Das intensivste Fragmentation in den Spektren der 2,4-Dimethoxyphenoxazone ist gleichzeitig auch charakteristisch für die Gesamtsubstitution im Ring C (Fragment $M-H_2O$), während die weniger intensiven Fragmente $M-CHO$ und $M-(CH_3+CO)$ auf das Vorhandensein je einer der beiden Methoxygruppen an C-2 und C-4 zurückzuführen sind. Nicht immer verursacht die Gesamtsubstitution jedoch den dominanten Fragmentierungsprozeß: Das Fragment mit der größten Intensität im Spektrum des 4-Ethyl-2-methoxyphenoxazons 61 ist das Ion $M-CHO$ (charakteristisch für die Methoxygruppe an C-2); weniger intensiv sind dagegen die für die Gesamtsubstitution spezifischen Fragmente $M-H_2O$ und $M-(H_2O+H)$.

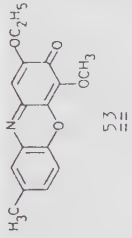
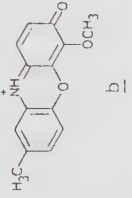
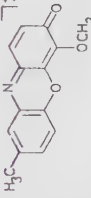
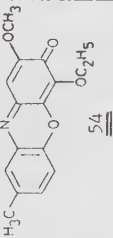
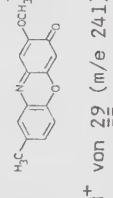
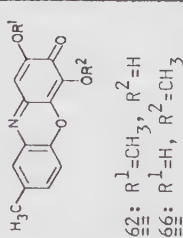
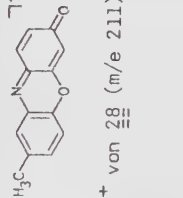
Massenspektrometrisch besonders gut unterscheidbar sind solche Phenoxazone, die bezüglich einer Substitution in den Positionen 2 und 4 isomer sind: dazu zählen die Monomethoxyphenoxazone 29 und 30, die Hydroxy-methoxyphenoxazone 62 und 66 und die Ethoxy-methoxyphenoxazone 53 und 54. Die eindeutige Differenzierung zwischen 2,4-Dimethoxyphenoxazonen und den isomeren 1,2- bzw. 1,4-disubstituierten Verbindungen ist möglich, da nur im erstgenannten Falle ein signifikantes Fragment $M-H_2O$ im Spektrum auftritt.

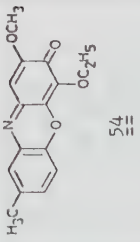
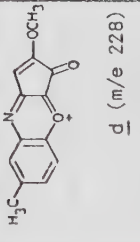
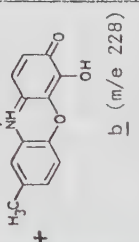
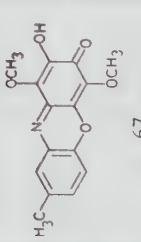
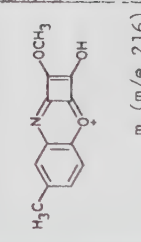
Massen- differenz Molekulation- Fragmention	abgespal- tene(s) Teilchen	Fragmention tritt signifikant auf im Spektrum von	Strukturvorschlag für Fragmention	Spektrum Seite	Bemerkungen
15ME	•CH ₃				uncharakteristische Abspaltung aus den meisten OCH ₃ -, OC ₂ H ₅ - und C ₂ H ₅ - Phenoxazonen. Hohe Fragment- intensität in den beiden letzten genannten Fällen
18ME	H ₂ O	a) $\text{R}^4 = \text{R}^5 = \text{H}, \text{R}^3 = \text{H} \text{ bzw. } \text{Cl}$ $\text{R}^1 = \text{R}^2 = \text{R}^3 = \text{H}$ $\text{R}^1 = \text{R}^2 = \text{H}, \text{R}^3 = \text{CH}_3$ $\text{R}^1 = \text{R}^2 = \text{H}, \text{R}^3 = \text{CH}_2\text{OH}$ $\text{R}^1 = \text{R}^2 = \text{H}, \text{R}^3 = \text{CH}_2\text{OAc}$ $\text{R}^1 = \text{R}^2 = \text{H}, \text{R}^3 = \text{NO}_2$ $\text{R}^1 = \text{R}^2 = \text{H}, \text{R}^3 = \text{R}^4$ $\text{R}^1 = \text{H}, \text{R}^2 = \text{CH}_3, \text{R}^3 = \text{Cl}$ $\text{R}^1 = \text{NO}_2, \text{R}^2 = \text{H}, \text{R}^3 = \text{Cl}$ b) $\text{R}^4 = \text{R}^5 = \text{H}, \text{R}^3 = \text{OCH}_3$ $\text{R}^1 = \text{H}, \text{R}^2 = \text{CH}_3$		57 57 25 57 79 81 82 115	charakteristischer Prozeß unter Bildung des inten- sivsten Fragmentions. Besonders hohe Fragment- intensität für R^1 bzw. $\text{R}^2 = \text{NO}_2$ und/oder $\text{R}^3 = \text{Cl}$ deutlich ausgeprägtes, jedoch nicht intensivstes Fragment spezifisch: M-33ME

Massen- differenz Molekülion- Fragmention	abgespal- tene(s) Teilchen	Fragmentation tritt signifikant auf im Spektrum von	Strukturvorschlag für Fragmention	Spektrum Seite	Bemerkungen
18 ME	H ₂ O	c) $\begin{array}{c} \text{R}^4 \\ \text{CH}_3 \\ \text{---} \end{array} \text{---} \begin{array}{c} \text{R}^3 \\ \text{---} \end{array} \text{---} \begin{array}{c} \text{R}^5 \\ \text{H} \\ \text{---} \end{array}$ $\underline{\underline{53}}: \text{R}^1=\text{H}, \text{R}^2=\text{CH}_3$	 $\underline{\underline{f'}}$	84	deutlich ausgeprägtes, jedoch nicht intensivstes Fragment siehe auch: M-43ME, M-44ME
19ME	H ₂ O+H•	 $\underline{\underline{61}}$	 $\underline{\underline{m/e\ 250}}$	100	deutlich ausgeprägtes, jedoch nicht intensivstes Fragment spezifisch: M-19ME dominant: M-29ME
19ME	H ₂ O+H•	 $\underline{\underline{61}}$	 $\underline{\underline{m/e\ 250}}$	100	spezifisches Fragment von mittlerer Intensität siehe auch: M-18ME dominant: M-29ME
28 ME	CO	a) $\begin{array}{c} \text{R}^2 \\ \text{CH}_3 \\ \text{---} \end{array} \text{---} \begin{array}{c} \text{R}^3 \\ \text{---} \end{array} \text{---} \begin{array}{c} \text{H} \\ \text{---} \end{array}$ $\underline{\underline{7}}: \text{R}^1=\text{R}^2=\text{R}^3=\text{H}$ $\underline{\underline{28}}: \text{R}^1=\text{CH}_3, \text{R}^2=\text{H}$ $\underline{\underline{56}}: \text{R}^1=\text{CH}_3, \text{R}^2=\text{OH}, \text{R}^3=\text{H}$ $\underline{\underline{57}}: \text{R}^1=\text{CH}_3, \text{R}^2=\text{R}^3=\text{OH}$	 $\underline{\underline{a}}$	43 43 96 96	intensivstes Fragment, sonst nur sehr geringe Fragmentierungstendenz

29 ME	•CHO	b) $\frac{R^2}{\text{---}} = \text{H}$ oder $\frac{\text{OH}}{\text{---}}$, $\frac{R^3}{\text{---}} = \frac{\text{CH}_3}{\text{---}}$ $\frac{55}{\text{---}}$: $R^1 = \text{CH}_3$, $R^2 = \text{H}$ $\frac{58}{\text{---}}$: $R^1 = \text{CH}_3$, $R^2 = \text{OH}$  $\frac{29}{\text{---}}$: R=H $\frac{50}{\text{---}}$: R=CH₃ $\frac{61}{\text{---}}$: R=C₂H₅ $\frac{62}{\text{---}}$: R=OH	 b	43 100 100 103	charakteristisch, da base peak bzw. intensivstes Fragment tritt mit geringerer In- tensität darüberhinaus bei allen im Ring C methoxysubstituierten Phenoxazonen auf bei R=C₂H₅: siehe auch M-18ME, M-19ME bei R=OH: siehe auch M-46ME
33 ME	H ₂ O+ $\dot{\text{C}}\text{H}_3$	$\frac{55}{\text{---}}$: R=H $\frac{58}{\text{---}}$: R=OH  $\frac{68}{\text{---}}$	 b	95 98	mittlere Intensität, begleitet von etwa gleich intensivem Ion bei M-28ME
		 $\frac{68}{\text{---}}$	 b	115	spezifisches und intensivstes Fragment siehe auch: M-18ME

Massen- differenz Molekülion- Fragmention	abgespal- tene(s) Teilchen	Fragmentation tritt signifikant auf im Spektrum von	Strukturvorschlag für Fragmention	Spektrum Seite	Bemerkungen
43 ME	$\bullet\text{CH}_3 + \text{CO}$	 a) $\text{R}^1, \text{R}^2 = \text{H}$ oder Cl $\text{30: R}^1 = \text{R}^2 = \text{R}^3 = \text{H}$ $\text{63: R}^1 = \text{R}^3 = \text{H}, \text{R}^2 = \text{Cl}$ $\text{64: R}^1 = \text{R}^2 = \text{Cl}, \text{R}^3 = \text{H}$ $\text{65: R}^2 = \text{R}^3 = \text{Cl}, \text{R}^1 = \text{H}$ b) $\text{R}^1 = \text{H}, \text{R}^2 = \text{OH}$ $\text{66: R}^3 = \text{H}$ c) $\text{R}^1 = \text{OCH}_3, \text{R}^2 = \text{OH}$ $\text{67: R}^3 = \text{H}$	 d	52 107 107 107	charakteristisch, da intensivstes Fragment (allerdings nur mittlere Intensität)
				109	mittlere Intensität, in- tensivstes Fragment: M-46ME
				112	rel. geringe Intensität, spezifisch: M-71ME
			 k, m/e 228  l, m/e 228	74	mittlere Intensität

	CH_3CO	 <u>53</u>	 <u>b</u>	84	mittlere Intensität, siehe auch: M-44ME M-18ME
44 ME	$\text{C}_2\text{H}_4\text{O}$	 <u>53</u>	 <u>53</u> M^+ von <u>30</u> (m/e 241)	84	hohe Intensität, für charakteristisch für Ethoxygruppe an C-2 oder C-4 <u>53</u>: siehe auch M-18ME M-43ME <u>54</u>: spezifisches Fragment bei M-57ME
		 <u>54</u>	 <u>54</u> M^+ von <u>29</u> (m/e 241)	88	aufgrund hoher Intensität spezifisches Fragment <u>62</u>: siehe auch M-29ME <u>66</u>: siehe auch M-43ME
46 ME	HCOOH	 <u>54</u> <u>62</u>: $\text{R}^1=\text{CH}_3$, $\text{R}^2=\text{H}$ <u>66</u>: $\text{R}^1=\text{H}$, $\text{R}^2=\text{CH}_3$	 <u>54</u> M^+ von <u>28</u> (m/e 211)	103 109	

Massen- differenz Molekulation- Fragmention	abgespal- tene(s) Teilchen	Fragmention tritt signifikant auf im Spektrum von	Strukturvorschlag für Fragmention	Spektrum Seite	Bemerkungen
57 ME	$\bullet C_2H_5 + CO$	 $\underline{\underline{54}}$	 $\underline{d}$ (m/e 228)  $\underline{b}$ (m/e 228) +	88	spezifisches, sehr intensives Fragmention siehe auch: M-44ME
71 ME	$\bullet CH_3 + CO + CO$	 $\underline{\underline{67}}$	 $\underline{m}$ (m/e 216)	112	spezifisches Fragment von mittlerer Intensität siehe auch: M-43ME

Tab.13: Korrelationen zwischen dem Auftreten charakteristischer
Fragmente in den Massenspektren und dem Substitutionsmuster
am Ring C der untersuchten Phenoxazone

3.5. Ausblick

Einige interessante Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bieten Ansatzpunkte zu weiteren experimentellen Untersuchungen: So erscheint etwa die Erforschung der Biogenese von Michigazon aufgrund des ungewöhnlichen Substitutionsmusters lohnend; ferner sollten einzelne Hypothesen zur massenspektrometrischen Fragmentierung von Phenoxazonen – darunter der "Ameisensäure-Mechanismus" – weiter abgesichert werden. Da wir in unserem Laboratorium – bedingt durch die Anschaffung eines neuen Gerätes – künftig in der Lage sein werden, durch Anwendung neuer Techniken (DADI-, linked scan- und evtl. auch CA-Spektroskopie (vgl.S.8ff)) genauere Einblicke in die Genese und Strukturen von Fragmentionen zu gewinnen, sind auf diesem Gebiet in Kombination mit weiteren Modellverbindungen und spezifischen Isotopenmarkierungen verfeinerte Ergebnisse zu erwarten.

Parallelen zwischen massenspektrometrischem und thermischem Zerfall sind literaturbekannt^{14,18,21,21a,22,23}). Es zeichnet sich ab, daß Massenspektren zur Detektion neuer Thermo- und Photoreaktionen in Zukunft von zunehmender Bedeutung sein werden^{25,26}). Das Auftreten so ungewöhnlicher Reaktionen wie der Wasserabspaltung aus den Molekülonen von 2,4-Dimethoxyphenoxazonen läßt die nähere Untersuchung der Gasphasenthermolyse²⁵⁾ dieser Verbindungen lohnend erscheinen: Könnte man nämlich die genannte Reaktion thermisch nachvollziehen, wäre damit möglicherweise ein präparativer Zugang zu einem neuen Ringsystem eröffnet (vgl.Strukturvorschlag f für das Fragmention M-H₂O auf Seite 67).

In ersten eigenen Versuchen mittels einer einfachen Apparatur (vgl.S.226) gelang es uns nicht, Produkte einer thermischen Wasserabspaltung aus 2,4-Dimethoxyphenoxazonen zu fassen. Stattdessen fanden wir, daß die

Methoxygruppe an C-4 selektiv in eine Hydroxyfunktion überführt werden kann, eine Reaktion, die ebenfalls präparativ interessant ist. Wir schließen aber nicht aus, daß mit einer leistungsfähigeren Apparatur bei höherer Energiezufuhr auch die Darstellung eines Wasserabspaltungsproduktes gelingen könnte und wollen daher weitere Versuche in dieser Richtung in Angriff nehmen.

4. EXPERIMENTELLER TEIL

4.1. Geräte und Methoden*)

Schmelzpunkte

Die Schmelzpunkte wurden auf einem Kofler-Heiztischmikroskop der Firma Reichert bestimmt und sind unkorrigiert.

^1H -Kernresonanzspektren

Zur Aufnahme der ^1H -NMR-Spektren dienten folgende Geräte: die FI-Spektren wurden mit den Typen HX 180-R, WH 270 und WH 360 der Fa. BRUKER-Physik aufgenommen, die CW-Spektren mit einem HA 100 der Fa. VARIAN.

Lösungsmittel: CDCl_3 bei den Phenoxazonen, $[\text{D}_6]$ DMSO bei den Benzochinonen. Innerer Standard: TMS, angegeben sind δ -Werte in ppm.

Massenspektren

Die EI-Spektren wurden mit einem SM1-B der Fa. VARIAN MAT aufgenommen. Ionenquelle: E111. Direkteinlaßsystem (Schubstange). Zur Registrierung verwendeten wir eine Auflösung von $M/\Delta M=1000$, zur Bestimmung der hochauflösten Daten arbeiteten wir bei einer Auflösung von $M/\Delta M=14000$ (10% Tal). Zur Auffindung metastabiler Signale wurden viele der Substanzen zusätzlich mit einem Gerät vom Typ CH4 der gleichen Firma vermessen. Ionenquelle: IO4, Direkteinlaßsystem (Ofenschleuse).

Die Ionisierungsenergie betrug normalerweise 70 eV. Die Isotopenanalysen der Molekülionen markierter Verbindungen erfolgten bei einer Ionisierungsenergie von 12-14 eV.

Die FD-Messungen erfolgten mit einem Gerät vom Typ MAT 731, ebenfalls von der Fa. VARIAN MAT. Fadenheizstrom: ca. 10 mA, Quelltemperatur: 80°C . Die Substanzen wurden direkt auf den Faden aufgebracht. Die Auflösung des Gerätes betrug $M/\Delta M=1000$ zur Aufnahme des Spektrums und $M/\Delta M=5000$ zum "peak matching".

Angegeben sind die Daten im allgemeinen für $m/e \geq 40$ (Werte ohne Klammer) und relative Intensitäten $\geq 5\%$ (Werte in Klammern).

Infrarotspektren

Die Aufnahme von IR-Spektren erfolgte auf einem Gerät vom Typ 457 der Fa. PERKIN-ELMER in Form eines KBr-Preßlings (Werte in cm^{-1}).

*) von der Tübinger Arbeitsgruppe ausgeführte Arbeiten sind mit ** gekennzeichnet

Elektronenspektren

Die UV/VIS-Spektren wurden auf einem Gerät vom Typ ZEISS DMR 21 aufgenommen. Lösungsmittel: Methanol p.a.

Gaschromatographie

Als Gaschromatograph stand ein Gerät der Baureihe 5750 der Fa. HEWLETT & PACKARD zur Verfügung. Detektor: WLD. Wir benutzten 2m-Glassäulen (1/4 Zoll) mit 2,5% SE 52 auf Chromosorb W-AW-DMCS (60/80 mesh). Trägergas: Helium (100 ml/min.). Temperaturen: Einspritzblock 220°C, Detektor 300°C, Temperaturprogramm: ab 100°C steigend mit 15°C/min.

Dünnschichtchromatographie

Zur Herstellung von DC-Platten verwendeten wir Kieselgel H (Fa.MERCK), Schichtdicke 0.25 mm bzw. 0.5 mm für präparative Platten. Nach Luft-trocknung erfolgte die Aktivierung der Platten (105°C/30 min.). Für die präparative DC wurden die Platten vor der Aktivierung nacheinander in Methanol und Chloroform/Methanol 9:1 gewaschen. Detektion von farblosen Substanzen: Joddampf, Fluoreszenzindikator F₂₅₄ (Fa.MERCK) und Eigenfluoreszenz. Bei Laufmittelgemischen werden immer Volumenanteile angegeben. Verwendete Abkürzungen: MeOH für Methanol, E.ester für Essigsäureethylester. Extraktion der ausgekratzten Banden nach präp. DC mit a) CHCl₃ und b) CHCl₃/MeOH 8:2.

Säulenchromatographie

als Sorbentien wurden Kieselgel 40 (Fa.MERCK, Abk.: KG 40), Kieselgel MN 60 (Fa. MACHEREY-NAGEL, Abk.: KG MN 60) und Kieselgel MALLINCKRODT verwendet.

Die Gelchromatographien wurden mit Sephadex LH-20 (Fa.PHARMACIA) und Merckogel OR-PVA-500 (Fa.MERCK) durchgeführt.

Die Detektion erfolgte nach Anfertigung von DC- bzw. Gaschromatogrammen der Einzelfractionen wie dort beschrieben. Die mikrobiologische Detektion erfolgte mittels Plattendiffusionstest unter Verwendung von Bacillus subtilis. Hierzu wurden Filterrondellen mit aliquoten Anteilen der Einzelfractionen getränkt.

Fermenter **

Die Fermentationen wurden in einem 10-l-Fermenter der Fa. NEW BRUNSWICK, N.Y., USA, Modell F-14, bzw. in einem 200-l-Fermenter der Fa. BIOLOGISCHE VERFAHRENSTECHNIK AG, Basel, Modell b 200, durchgeführt.

Fermentation von Iü 1074 und Rohrtrennung - Standardverfahren **

Der Actinomycetales-Stamm Iü 1074 wurde aus einer in El Djem, Tunesien, gesammelten Bodenprobe gewonnen. Die artbestimmenden Merkmale stimmen mit denen von Streptomyces michiganensis überein¹⁸¹⁾. Der Stamm wurde submers bei 27°C in 10 l Nährlösung (1% Sojamehl, 2% Glycerin, 1% CaCO₃) bei 220 Umdrehungen des Rührers und einer Belüftung von 2 l Luft/min. angezogen. Es wurde mit 10% Inoculum beimpft. Man testete die Kultur im Hinblick auf antibiotische Wirkung und auf Pigmentgehalt.

Nach 5-6 Tagen (=maximale antibiotische Wirkung) wurde die Fermentation beendet, die Kultur zur Abtrennung des Mycels filtriert und das Kulturfiltrat einmal mit 1/5 des Volumens Chloroform und zweimal mit 1/10 des Volumens Chloroform extrahiert. Nach Einengung der Chloroformextrakte im Rotationsverdampfer erfolgte Säulenchromatographie an 100 g Aluminiumoxid N (WOELM, Akt.III) mit Chloroform als Laufmittel. Auf diese Weise erhielt man aus 10 l Nährlösung ca. 100 mg angereichertes Pigmentgemisch mit antibiotischer Wirkung.

Optimiertes Verfahren zur Produktion von rotem Pigment **

Der Stamm Iü 1074 wurde submers bei 27°C in 10 l Nährlösung (1% Sojabohnenmehl, 2% Glycerin, 1% CaCO₃ unter Zusatz von 7 ml 5 N KOH) bei 350 U/min. des Rührers und einer Belüftung von 4 l Luft pro Minute angezogen. Bereits nach 24 Std. war mit 10 µg/ml die maximale Konzentration des roten Pigmentes erreicht. Zu diesem Zeitpunkt war in der Kultur kein Antibiotikum nachweisbar.

Übertragung der Fermentation auf Großfermenter **

Im 200-l-Fermenter wurde das oben beschriebene Medium bei 27°C mit 900 U/min. (Umwurfsystem) gerührt und mit 2500 l Luft pro Stunde belüftet. Die Übertragung der Fermentation auf diesen Maßstab brachte jedoch schwankende Ausbeuten. Insbesondere war die Bildung von rotem Pigment stark unterdrückt und mitunter nicht mehr nachweisbar. Versuche zur Optimierung wurden nicht durchgeführt.

Gehaltsbestimmung im Kulturmedium **

60 ml Kulturfiltrat wurden mit 10 ml Chloroform extrahiert und 3 ml der organischen Phase im Vakuum eingeeengt. Der trockene Rückstand wurde in 50 µl Chloroform aufgenommen und davon 20 µl auf Kieselgel (DC-Alufolie,

Kieselgel F₂₅₄ MERCK) punktförmig aufgetragen und mit CHCl₃/MeOH 9:1 chromatographiert. Dabei erfolgte Auftrennung in ein rotes Pigment ($R_f=0.7$) und ein violettes Pigment ($R_f=0.3$).

Der rote Fleck ($R_f=0.7$) wurde abgekratzt und mit 2 ml Ethanol extrahiert. Die Extinktion dieser Lösung bei 380 nm wurde als Maß für den relativen Gehalt an rotem Pigment herangezogen. Nach Kenntnis des Extinktionskoeffizienten der Reinsubstanz konnte auf den absoluten Gehalt umgerechnet werden.

Violettes Pigment: das Chromatogramm wurde 10 Minuten auf eine Agarplatte gelegt (Medium: 8 g Glucose, 4 g Ammoniumtartrat, 5 g NaCl, 2 g K₂HPO₄, 1 g MgSO₄·7H₂O, 0.2 g CaCl₂, 10 mg MnSO₄·7H₂O, 15 g Agar, 1 l Wasser). Der Agar enthielt Sporen von Bacillus subtilis. Nach 16 Std. Inkubation bei 37°C wurde nur bei $R_f=0.3$ (=violettes Pigment) ein Hemmhof beobachtet. Die Gehaltsbestimmung erfolgte anhand der antibiotischen Wirksamkeit direkt aus dem Kulturfiltrat im Plattendiffusionstest mit B. subtilis. Zur Ermittlung des absoluten Gehaltes wurden (nach Abklärung der chemischen Struktur) die Vergleichswerte von Mitomycin C herangezogen.

Sedimentbestimmung **

10 ml Kultur wurden in graduieren Zentrifugengläsern abzentrifugiert (10 min. bei 4000 U/min.) und anschließend das Volumen des Sedimentes abgelesen.

4.2. Isolierung und Strukturermittlung der Pigmente

Isolierung des violetten Pigmentes

Da sich zeigte, daß die antibiotische Wirkung bei der Aufarbeitung und bereits beim Stehen der Ansätze abnimmt und insbesondere bei der üblichen Rohtrennung (s.o.) die Säulenchromatographie an Aluminiumoxid zu einem schnellen Wirkungsverlust führt, gingen wir wie folgt vor: Der aus einer 200-l-Fermentation gewonnene Chloroformextrakt (insgesamt 9 ml eines dunkelbraunen Schleimes) wurde mit 20 ml Methanol versetzt, die Lösung von minimalen Resten ungelösten Rückstandes abfiltriert und in drei gleichen Portionen aufgetrennt:

Zunächst wurde das Filtrat an 85 g Sephadex LH-20 mit CHCl₃/MeOH 3:7 als Laufmittel in 50 Fraktionen zu je 8 ml zerlegt. Nach DC-Kontrolle (CHCl₃/MeOH 9:1) wurden vier Sammelfraktionen gebildet:

Fraktionen	Sammelfraktionen	Rückstandsgewicht
1-11	I	800 mg
12-17	II	100 mg
18-28	III	100 mg
29-50	IV	200 mg

Für den Plattendiffusionstest wurden Filterrondellen von jeder der vier Sammelfraktionen präpariert. Dabei erwies sich ausschließlich die Fraktion III als antibiotisch aktiv.

Fraktion III (100 mg) wurde an 15 g Merckogel OR-PVA-500 chromatographiert ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 3:7). Insgesamt wurden 20 Fraktionen zu je 4 ml aufgefangen. DC-Kontrolle: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1. Bildung dreier Sammelfraktionen, wobei Sammelfraktion II die das violette Pigment ($R_f=0,3$) enthaltenden Fraktionen zusammenfaßt:

Fraktionen	Sammelfraktionen	Rückstandsgewicht
1-4	I	15 mg
5-7	II	50 mg
8-20	III	20 mg

Im Plattendiffusionstest erwies sich ausschließlich Fraktion II als antibiotisch aktiv.

Fraktion II (50 mg, vgl. Abb. 3, S. 18: Rohprodukt 2) wurde in wenig Essigester gelöst und an 50 g Kieselgel MALLINCKRODT in 90 Fraktionen zu je 8 ml zerlegt. Es wurde zunächst mit Essigester, anschließend mit E. ester/MeOH 95:5 eluiert. DC-Kontrolle: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1. Bei der Elution unter Methanolzusatz erfolgte in den Fraktionen 43 und 44 die Abtrennung der violetten Farbzone:

Fraktionen	Sammelfraktionen	Rückstandsgewicht
1-42	I	13 mg
43+44	II	18 mg
45-90	III	10 mg

Ausschließlich Fraktion II erwies sich im Plattendiffusionstest als antibiotisch aktiv.

Fraktion II (=Rohprodukt 3, 18 mg) haben wir durch präparative DC mit $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1 getrennt. Dabei wurde eine Auftrennung in eine violette Zone ($R_f=0.3$) und eine farblose Zone mit starker Jodanfärbung ($R_f=0.5-0.6$, Hauptkomponente) erzielt. Die violette Zone wurde extrahiert: 1 mg Rohprodukt 4.

Nochmalige präparative DC mit E.ester/MeOH 95:5 erbrachte 0.1 mg violettes Reinpigment ($R_f=0.35$), dessen methanolische Lösung im Kühlschrank längere Zeit haltbar ist.

Nach gleicher Aufarbeitung der verbleibenden 2/3 des Chloroformextraktes der Kulturlösung erhielten wir insgesamt ca. 0.4 mg violettes Reinpigment, das im Plattendiffusionstest noch in hoher Verdünnung das Wachstum von Bacillus subtilis hemmt.

Spektroskopische Daten des violetten Pigmentes

UV: 316 nm ($\lg \epsilon$ 3.95) und 518 nm ($\lg \epsilon$ 3.00)

FD-MS: m/e(%): 351(9), 350(47), 349(100, M^+), 318(9), 223(24), 217(7), 216(31).

FD-MS von Mitomycin C: m/e(%): 336(14), 335(52), 334(100, M^+), 302(6), 292(14), 291(38), 273(5), 242(5)

Hochaufgelöste MS-Daten: violettes Pigment: $349.1200 = C_{16}H_{19}N_3O_6$ (M^+).
als Referenzmasse diente das Molekölion von
Mitomycin C: $334.1277 = C_{15}H_{18}N_4O_5$.

Vergleich mit authentischem Mitomycin A

Das violette Pigment wurde mit authentischem Mitomycin A (aus Tübingen) verglichen: keine Unterschiede in den UV/VIS-Spektren und im DC-Laufverhalten in zwei verschiedenen Laufmitteln: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1 ($R_f=0.3$) und E.ester/MeOH 95:5 ($R_f=0.35$).

Isolierung des roten Pigmentes

140 mg angereichertes Pigmentgemisch aus Fermentationen nach dem optimierten Verfahren (vgl. Abb. 5, S. 24: Rohprodukt 1) wurden in wenig $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 3:7 gelöst und mit dem gleichen Laufmittel an 85 g Sephadex LH-20 chromatographiert. 60 Fraktionen zu 8 ml, DC-Kontrolle: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1, GC-Kontrolle. Es erfolgte Auftrennung in zwei rote Zonen: zunächst wird die Hauptkomponente und dann mit dem größeren Elutionsvolumen die mengenmäßig sehr viel geringere Nebenkompente, die nicht näher untersucht wurde, eluiert;

Fraktionen	Sammelfraktionen	Rückstandsgewicht
1-12	Vorlauf	40 mg
13-16	rote Zone I	70 mg
17+18	Zwischenfraktion	5 mg
19+20	rote Zone II	3 mg
21-60	Nachlauf	12 mg

Die rote Zone I (=Rohprodukt 2)(70 mg) wurde in derselben Weise re-chromatographiert, wobei die Abtrennung einer weiteren geringen Menge an "roter Zone II" erfolgt (1 mg). Man erhält insgesamt 48 mg Roh-produkt 3, das sich im GC immer noch als komplexes Gemisch erweist (vgl.abb.6,S.24).

Durch Digerieren des Rohproduktes 3 (48 mg) mit 2x5 ml Diethylether kann die Hauptmenge der noch vorhandenen Verunreinigungen entfernt werden (GC-Kontrolle). Man erhält 18 mg in Diethylether schwerlösliches Rohprodukt 4.

Die abschließende Reinigung des Rohproduktes 4 erfolgt an 25 g Kiesel-gel MALLINCKRODT mit $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 98:2. Nach Abtrennung von wenig Vor- und Nachlauf erhielten wir 15 mg Reinsubstanz (GC-einheitlich).

Nach Aufarbeitung weiterer 150 mg des Rohproduktes 1 standen insgesamt 30 mg rotes Reinpigment für die Strukturaufklärung zur Verfügung. Im Plattendiffusionstest erweist sich die Substanz als inaktiv gegenüber Bacillus subtilis.

Physikalische und spektroskopische Daten des roten Pigmentes

Aus Methanol rote Kristallbüschel vom Schmp. 211-213°C.

Gut löslich in DMSO und Pyridin, weniger in Chlörform, relativ schlecht in anderen org. Lösungsmitteln.

GC: $T_D=255^\circ\text{C}$, DC: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 95:5 ($R_f=0.3$), $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1 ($R_f=0.7$).

MS: m/e(%) 289(6),288(18),287(100, M^+),286(16),285(5),273(6),272(33),
270(17),269(50),268(7),258(22),257(12),256(8),255(6),244(20),
243(9),242(6),241(17),240(9),239(8),228(15),227(6),226(8),
216(5),214(6),212(8),211(8),198(5),186(6),173(11),144(5),
93(7),77(8),65(5),51(5). (vgl.Abb.7,S.25)

Mit CH_3OD ist ein austauschbares Proton feststellbar.

Hochaufgelöste MS-Daten: 287.0789 = $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{NO}_5$ (M^+)

$^1\text{H-NMR}$ (180 MHz-FT): δ = 7.68 ppm (1H,d,J=2Hz), 7.46(1H,dd,J=8Hz und 2Hz),
(vgl. Abb. 10, S. 29) 7.38(1H,d,J=8Hz), 6.50(1H,s), 4.76(2H,s),
4.03(3H,s), 3.93(3H,s), 1.88(breites s).

IR: 3400 (breit), 1635, 1580, 1310, 1232, 1105 cm^{-1} . (vgl. Abb. 9, S. 27)

UV: λ_{max} (lg ϵ) = 226(4.46), 260(4.14), 385(4.30), 460 nm(3.81).

(vgl. Abb. 8, S. 27).

Katalytische Hydrierung des roten Pigmentes

Ca. 1 mg rotes Pigment wurde in 2 ml Methanol p.a. gelöst und bei RT und Normaldruck etwa 10 Min. an Pd/C(5%) hydriert, wobei Entfärbung der roten Lösung eintritt. Unter Stickstoff filtriert man anschließend vom Katalysator ab, rotiert die Lösung ein und verwendet den Rückstand direkt zur Aufnahme des Massenspektrums. Entsprechend der Aufnahme von 1 Mol H_2 pro Mol des roten Pigmentes findet man das Molgewicht 289.

Bei Luftzutritt erfolgt sofortige Rückoxydation zum roten Pigment.

Acetylierung des roten Pigmentes

10 mg rotes Pigment werden in 1 ml trockenem Pyridin gelöst und mit der gleichen Menge Acetanhydrid versetzt. Man läßt über Nacht bei RT stehen, rotiert die Lösung ein, nimmt in wenig Chloroform auf und chromatographiert zur Reinigung über präparative DC-Platten mit $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 99:1 ($R_f=0.3$). Quantitative und einheitliche Umsetzung.

Schmp. 191-192°C (nach GC-Passage)

GC: $T_D=262^\circ\text{C}$

MS: m/e(%) 331(6), 330(19), 329(100, M^+), 328(11), 315(5), 314(24), 312(12),
311(52), 300(17), 299(9), 286(11), 283(8), 270(15), 269(5), 227(5),
224(5), 184(5), 93(6), 89(6), 77(5), 43(21). (vgl. Abb. 37, S. 57)

Hochaufgelöste MS-Daten: 329.0906 = $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{NO}_6$ (M^+) 286.0713 = $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{NO}_5$
311.0794 = $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{NO}_5$ 283.0842 = $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{NO}_4$
300.0873 = $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{NO}_5$ 270.0764 = $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{NO}_4$

$^1\text{H-NMR}$ (180 MHz-FT): δ = 7.71 ppm (1H,d,J=2Hz), 7.46(1H,dd,J=8Hz und 2Hz),
7.39(1H,d,J=8Hz), 6.52(1H,s), 5.16(2H,s),
4.04(3H,s), 3.95(3H,s), 2.13(3H,s).

(vgl. Abb. 10, S. 29)

IR: 1745, 1635, 1580, 1300, 1230, 1100 cm^{-1}

UV: 457, 383, 260, 226 nm

Alkalischer Abbau von 2-Acetoxyphenoxazon (13)

Der Abbau erfolgte in Anlehnung an ^{80a,81}. Darstellung von 13: Seite 204.

In ein auf 110°C vorerwärmtes Ölbad taucht man ein Spitzkölbchen mit Rückflußkühler ein, das zuvor mit 5 mg 13 und 2 ml 5N NaOH beschickt wurde. Unter Rühren erhitzte man 6 Minuten am Rückfluß, wobei zunächst Farbwechsel von rot nach rotviolett auftritt, bis die Lösung schließlich homogen und fast farblos wird. Nach dem Abkühlen wird mit Wasser verdünnt, dann mit 5N HCl auf Neutralpunkt titriert und einrotiert. Man digeriert mit Methanol, zentrifugiert vom Kochsalz ab und rotiert wieder ein. Diese Operation wird noch einmal mit weniger Methanol wiederholt. Trennung über präp. DC-Platten mit CHCl₃/MeOH 9:1. Nach zweimaliger Entwicklung der Platten erhält man zwei Banden:

R_f=0.7: 0.5 mg gelbbraune Substanz vom Molgewicht 212 (massenspektrometrisch), identisch (MS,DC) mit 2-Aminophenoxazon

R_f=0.5: 0.8 mg farblose Substanz (Fluoreszenzlösung), Molgewicht 109 (massenspektrometrisch), identisch (MS,DC) mit o-Aminophenol

0.5 mg o-Aminophenol wurden unter Standardbedingungen (S.200) acetyliert. Gaschromatographisch war nur ein einziges Umsetzungsprodukt nachweisbar, welches mikropräparativ am Ausgang des WLD aufgefangen wurde. Das massenspektrometrisch ermittelte Molgewicht beträgt 235 (Triacetyl-derivat).

Alkalischer Abbau des roten Pigmentes

Es wurde die für 13 angegebene Arbeitsvorschrift übertragen:

Ansatz: 5 mg rotes Pigment, 2 ml 5N NaOH, 5 Min. Rückfluß.

Reinigung: DC-Platte mit CHCl₃/MeOH 9:1, 3x entwickelt. Die mit

R_f=0.1-0.2 laufende farblose Hauptkomponente (Fluoreszenzlösung, Jod-Anfärbung) wurde isoliert: ca. 1 mg.

Massenspektrometrisch ermitteltes Molgewicht: 139.

Die Substanz wurde unter Standardbedingungen acetyliert. Das GC-einheitliche Umsetzungsprodukt wurde am Ausgang des WLD mikropräparativ aufgefangen. Massenspektrometrisch ermitteltes Molgewicht: 307 (Tetraacetylderivat).

Das Abbauprodukt erwies sich als identisch (DC,MS) mit synthetischem 3-Amino-4-hydroxybenzylalkohol(14, Synthese S.192). Die Tetraacetyl-derivate des Abbauproduktes und von 14 stimmten ebenfalls in den geprüften Eigenschaften überein (MS,GC-Mischinjektion).

4.3. Synthesen

4.3.1. 2-Aminophenole

3-Amino-4-hydroxybenzylalkohol(14)

a) 4-Hydroxy-3-nitrobenzoesäuremethylester(17)

36.6 g 4-Hydroxy-3-nitrobenzoesäure (0.2 mol) werden unter Zugabe von 19.2 g Methanol und 3 ml konz. Schwefelsäure in 80 ml Tetrachlorkohlenstoff verestert (10 h/Rückfluß). Nach Aufarbeitung erhält man aus Methanol/Wasser 27.6 g (70%) Methylester in hellgelben Kristallen vom Schmp. 71-73°C (Lit.¹⁸²) 74°C).

b) 3-Amino-4-hydroxybenzoesäuremethylester(18)

25 g 17 werden in Methanol an 1.2 g Pd(5% auf Kohle) hydriert. Nach 12 h ist die berechnete Menge H₂ aufgenommen. Aufarbeiten und Kristallisieren aus CHCl₃/MeOH 3:1 ergibt 20 g (95%) 18 in farblosen Kristallen vom Schmp. 113°C (Lit.¹⁸³) 110-111°C(aus CHCl₃) und 142°C(aus Benzol)).

c) 3-Amino-4-hydroxybenzylalkohol(14)

Zu einer Lösung von 1.4 g Lithiumaluminiumhydrid in 40 ml wasserfreiem THF tropft man eine Lösung von 6 g 18 in 40 ml wasserfreiem THF bei +5 bis 10°C innerhalb 1 h. Danach wird der Ansatz 1 h bei 40°C gehalten, mit 100 ml THF versetzt und überschüssiges Reduktionsmittel durch Wasszugabe zerstört. Man neutralisiert mit verd. Salzsäure und rührt noch 30 min. Nach Filtrieren wird zur Trockne eingeengt, mit Methanol aufgenommen, nach Behandlung mit Aktivkohle erneut eingeengt und aus CHCl₃/MeOH 9:1 kristallisiert.

Ausbeute: 1.8 g (35%) farblose Kristalle

Schmp. 143-145°C (Lit.¹⁸⁴) 112-114°C)

Analyse: C₇H₉NO₂ (139.1) Ber. C 60.41 H 6.52 N 10.07

Gef. C 60.33 H 6.67 N 9.81

Mol.-Masse 139(MS)

2-Amino-p-kresol(105)

50 g 2-Nitro-p-kresol (0.33 mol) werden in ca. 100 ml Methanol unter Zusatz von 2.5 g Pd/Kohle(10%) bei RT und Normaldruck hydriert. Nach Aufnahme der berechneten Menge Wasserstoff wird vom Katalysator abfiltriert. Beim Einengen der Lösung kristallisiert das Produkt aus. Man saugt ab, wäscht mit wenig kaltem Methanol nach und trocknet über CaCl₂.

Ausbeute: 30 g (75%)

Schmp. 136-137°C (Lit.¹⁸⁵) 135°C)

2-Amino-3-methoxyphenol(137)

a) 3-Methoxy-2-nitrophenol(141)

Die Darstellung erfolgte in Anlehnung an¹⁴⁴⁾.

10 g (65 mmol) 2-Nitroresorcin(140) werden im Dreihalskolben unter Rühren mit 9 g KOH (160 mmol) in Form einer 10%igen wässrigen Lösung versetzt (Überleiten von Stickstoff). Man tropft 65 mmol Dimethylsulfat (8.1 g, 6.1 ml) so zu, daß die Temperatur 40°C nicht übersteigt. Anschließend wird der Ansatz noch 30 min. bei ca. 80°C belassen. Nach dem Abkühlen saugt man durch eine Fritte ab und erhält als Rückstand 3.6 g 1,3-Dimethoxy-2-nitrobenzol.

Das Filtrat wird angesäuert, mit Ether extrahiert, die organische Phase über Na₂SO₄ getrocknet und einrotiert. Man nimmt in wenig CHCl₃ auf und chromatographiert über 400 g Kieselgel MN 60 mit CHCl₃ als Laufmittel. Zunächst wird 1 g unverändertes 140 eluiert, anschließend 5 g (46%) gelbes 141.

Schmp. 53°C (Lit¹⁴⁴⁾ 53-54°C)

b) 2-Amino-3-methoxyphenol(137)

4 g 141 werden in 70 ml MeOH unter Zugabe von 200 mg Pd/Kohle(10%) über Nacht bei RT und 80 atm. hydriert. Man filtriert vom Katalysator ab, rotiert ein und chromatographiert an 200 g Kieselgel MN 60 mit CHCl₃/MeOH 95:5. Abschließende Reinigung durch Umkristallisation aus Benzol.

Ausbeute: 2.4 g (73%)

Schmp. 124-126°C

Hochaufgelöste MS-Daten: 139.0630 = C₇H₉NO₂ (M⁺)

4.3.2. 1,4-Benzochinone

2-Methoxy-1,4-benzochinon(23)

die Darstellung erfolgte durch Oxydation von o-Anisidin nach¹⁴⁵⁾.

Ansatz: 20 g o-Anisidin

Ausbeute: 3.4 g 23 (15%)

Schmp. 136-138°C(Lit¹⁴⁵⁾ 140°C)

¹H-NMR (100 MHz): vgl. Tab.3, S.36

2,5-Dihydroxy-1,4-benzochinon(69)

Die Darstellung erfolgte durch Oxydation von Hydrochinon nach¹³⁷⁾.

Ansatz: 27.5 g Hydrochinon

Ausbeute: 20 g 69 (57%)

Schmp. 211-213°C(Zers.)(Lit.¹³⁷⁾ 212-214°C(Zers.))

MS: m/e(%) 141(9), 140(100, M⁺), 112(6), 94(6), 84(11), 71(31), 70(16),
69(33), 66(8), 53(10), 43(11), 42(37), 41(12).

2,5-Dimethoxy-1,4-benzochinon(24)

500 mg 69 werden in möglichst wenig Methanol unter Eiskühlung mit etherischer Diazomethanolösung methyliert, wobei das Produkt in gelben Flocken ausfällt. Man saugt ab, wäscht mit wenig Methanol nach und trocknet.

Ausbeute: 510 mg (85%)

Schmp. 240°C(Zers.)(Lit.¹⁸⁶⁾ 220°C(Zers.))

MS: m/e(%) 168(19, M⁺), 153(34), 150(7), 140(8), 139(71), 138(10), 125(19),
122(12), 111(13), 110(12), 95(35), 69(100), 66(5), 59(32), 57(13),
53(29), 41(11).

Hochaufgelöste MS-Daten: 168.0422 = C₈H₈O₄ (M⁺)

¹H-NMR (100 MHz): vgl.Tab.3, S.36

2,5-Dihydroxy-3-methyl-1,4-benzochinon(92)

Die Darstellung erfolgte in Anlehnung an¹³⁷⁾.

In einem 100 ml-Dreihalskolben legt man 34 g 50%ige Natronlauge (0.43 mol) vor und löst darin 5.2 g Methylhydrochinon (42 mmol). In die gut gerührte Lösung tropft man 17 ml 30%iges H₂O₂ (0.17 mol) derart ein, daß die Temperatur zwischen 45°C und 50°C gehalten werden kann (Innenthermometer, Eisbad!). Nach beendeter Zugabe rührt man noch 1.5 h weiter und achtet dabei ständig auf Einhaltung des o.a. Temperaturbereiches!

Anschließend rührt man die Reaktionsmischung in 80 g Eis ein und säuert mit einer Mischung von 40 g konz. HCl und 50 g Eis an. Man ethert mehrfach aus und trocknet die Extrakte über Na₂SO₄. Nach dem Abfiltrieren des Trockenmittels rotiert man ein und digeriert den Rückstand mit wenig Methanol. Der schwerer lösliche Rückstand besteht aus MS-reinem Produkt (1.6 g). Durch Chromatographie der methanolischen Lösung an Kieselgel mit CHCl₃/MeOH 9:1 bis 8:2 erhält man eine zweite Charge des Produktes (400 mg).

Ausbeute: 2.0 g (32%)

Schmp. 170°C (Lit.¹⁸⁷⁾ 184°C)

2,5-Dihydroxy-3-ethyl-1,4-benzochinon(115)

Die Vorschrift zur Darstellung von 92 wurde übertragen.

Ansatz: 5.7 g Ethylhydrochinon

Ausbeute: 1.1 g 115 (16%)

Schmp. 150-152°C

Hochaufgelöste MS-Daten: m/e 168.0420 = C₈H₈O₄ (M⁺)

2,6-Dimethoxy-1,4-benzochinon(25)

a) Pyrogalloltrimethylether(96)

Die Darstellung erfolgte in Anlehnung an^{188,131)}.

In einem Kolben mit Rührer, Rückflußkühler und Tropftrichter legt man 126 g Pyrogallol (1 mol), 570 g Dimethylsulfat (4.5 mol), 300 ml Ethanol und 10 g Natriumdithionit vor. Unter Stickstoffatmosphäre tropft man Natronlauge (180 g NaOH=4.5 mol auf 450 ml aufgefüllt) so zu, daß die Temperatur zwischen 18°C und 22°C gehalten werden kann (einige Stunden, Wasserkühlung). Nach beendeter Reaktion rührt man weitere 6 h, kühlt mit Eis und gibt 1 kg zerstoßenes Eis zu. Die anfallenden weißen Kristalle werden abgesaugt, gewaschen und getrocknet.

Ausbeute: 140 g (83%)

Schmp. 47°C (Lit.^{188a)} 47°C)

b) 2,6-Dimethoxy-1,4-benzochinon(25)

Die Darstellung erfolgte in Anlehnung an^{131,189)}.

135 g 96, 680 ml Ethanol und 680 ml Salpetersäure (d=1.2) werden auf 35°C erwärmt. Man läßt stehen, bis die heftige Reaktion einsetzt und hält die Temperatur dann knapp unterhalb 50°C, bis die Reaktionswärmeentwicklung nachläßt (ca.15 min.). Nach 4-stündigem Stehen unter gelegentlichem Umschütteln wird das Chinon abgesaugt, mit Ethanol (350 ml) und Wasser (700 ml) gewaschen und getrocknet.

Ausbeute: 100 g (74%)

Schmp. 255°C (Lit.¹⁸⁹⁾ 255°C)

MS: m/e(%) 169(9), 168(100, M⁺), 153(5), 140(8), 138(32), 125(14), 112(5),
97(12), 82(5), 80(41), 69(95), 59(19), 57(13), 55(6), 54(5),
53(22), 41(9).

¹H-NMR(100 MHz): vgl.Tab.3, S.36

2,5-Dimethoxy-3-hydroxy-1,4-benzochinon(70)

a) 2,6-Dimethoxyhydrochinon(108)

Die Darstellung erfolgte in Anlehnung an¹³¹⁾.

Man legt 98 g 25 (0.58 mol) und 200 g Natriumdithionit (1.15 mol) vor und gibt möglichst schnell 1 Liter kochendes Wasser zu. Man schüttelt kräftig durch, bis eine klare Lösung entstanden ist (ca. 1 min.).

Anschließend schnelles Abkühlen unter fließendem Wasser. Nach 30 min. wird das Produkt abgesaugt, mit 500 ml Eiswasser gewaschen und getrocknet.

Ausbeute: 83 g (84%)

Schmp. 158°C (Lit.¹⁹⁰⁾ 158°C)

b) 1,2,3,5-Tetramethoxybenzol(109)

Die Darstellung erfolgte in Anlehnung an¹³¹⁾.

Man legt eine Mischung von 55 g 108 (0.32 mol), 130 ml Ethanol, 250 g Dimethylsulfat (2 mol) und 4 g Natriumdithionit vor und tropft unter CO₂-Atmosphäre und gutem Rühren eine Lösung von 80 g NaOH (2 mol) in 180 ml Wasser tropfenweise innerhalb 4 h so zu, daß die Temperatur zwischen 15°C und 20°C gehalten werden kann. Anschließend wird der Ansatz 30 min. auf dem Wasserbad erwärmt, mit 500 ml Wasser verdünnt und gekühlt. Nach dem Absetzen saugt man das feste Produkt ab, wäscht und trocknet.

Ausbeute: 48 g (75%)

Schmp. 41°C (Lit.¹³¹⁾ 47°C)

c) 2-Hydroxy-3,4,6-trimethoxyacetophenon(110)

Die Darstellung erfolgte nach¹³¹⁾ aus 109.

Ansatz: 45 g 109

Ausbeute: 32 g 110 (63%)

Schmp. 103°C (Lit.¹³¹⁾ 103-105°C)

d) 1,2-Dihydroxy-3,4,6-trimethoxybenzol(111)

Die Darstellung erfolgte nach¹³¹⁾ aus 110.

Ansatz: 22.6 g 110

Ausbeute: 10 g 111 (50%)

Schmp. 77-78°C (Lit.¹³¹⁾ 82°C)

e) 2,5-Dimethoxy-3-hydroxy-1,4-benzochinon(70)

Die Darstellung erfolgte in Anlehnung an ¹³¹⁾.

1.4 g 111 (7 mmol) werden in 50 ml Wasser gelöst und bei RT tropfenweise mit einer Lösung von 2.8 g Eisen(III)chlorid (17 mmol) in 15 ml Wasser versetzt. Bereits während der Zugabe fällt das Produkt in roten Kristallen aus. Nach beendeter Zugabe rührt man noch 1 h weiter. Man saugt ab, wäscht mehrmals mit kleinen Portionen Eiswasser nach und trocknet (12 h i. Vak., 50°C, P₂O₅).

Ausbeute: 730 mg (57%)

Schmp. 200°C (Lit. ¹³¹⁾ 208°C)

MS: m/e(%) 185(10), 184(100, M⁺), 183(5), 169(42), 142(6), 141(11), 139(15),
113(34), 111(12), 85(36), 71(5), 70(7), 69(36), 55(7), 54(6),
53(21), 43(5), 42(8), 41(7).

2,5-Dihydroxy-3-methoxy-1,4-benzochinon(98)

a) 3,5-Dibrom-2,6-dimethoxy-1,4-benzochinon(96)

Die Darstellung erfolgte in Anlehnung an ¹³³⁾.

19 g 2,6-Dimethoxy-1,4-benzochinon(25) (0.11 mol) werden in 100 ml CHCl₃ gelöst. In die zum Sieden erhitzte Lösung tropft man eine Lösung von 9 ml Brom (0.18 mol) in 9 ml CHCl₃ langsam zu und erhitzt anschließend noch 30 min. am Rückfluß. (Evtl. DC-Kontrolle der Bromaufnahme mit E. ester/Benzol 1:1 als Laufmittel.) Nach dem Einrotieren verbleibt ein roter Trockenrückstand, der mit kleinen Portionen Ethanol digeriert wird: dabei wird die Monobromverbindung (wenig) gelöst, während die Dibromverbindung im Rückstand verbleibt. Der Rückstand wird aus Ethanol umkristallisiert.

Ausbeute: 25,7 g (90%)

Schmp. 177°C (Lit. ¹³³⁾ 174-176°C)

b) 6-Brom-2,5-dihydroxy-3-methoxy-1,4-benzochinon(97)

Die Darstellung erfolgte in Anlehnung an ¹³³⁾.

21 g 96 (64 mmol) werden in 50 ml Methanol suspendiert und unter Eiskühlung mit 250 ml 1N NaOH versetzt. Man kocht 2 min. auf und filtriert. Nach dem Abkühlen wird das Filtrat mit konz. HCl angesäuert, wobei braunviolette Blättchen des Produktes ausfallen. Man saugt ab, wäscht und trocknet.

Ausbeute: 10.4 g (65%)

Schmp. 196-198°C (Lit.¹³³) 203-205°C (Zers.)

Hochaufgelöste MS-Daten: m/e 247.9324 = $C_7H_5O_5^{79}Br$ (M^+ für ^{79}Br)

c) 2,5-Dihydroxy-3-methoxy-1,4-benzochinon(98)

Die Darstellung erfolgte in Anlehnung an¹³³.

540 mg 97 (2 mmol) wurden unter Eiskühlung in 10 ml 2N NaOH gelöst, mit 100 mg Pd/Kohle(5%) versetzt und im Kleinautoklaven unter Schütteln hydriert (3 atm., RT, 3 h). Anschließend wird mit Wasser verdünnt, 2 h an der Luft heftig gerührt (zwecks Rückoxydation vom Hydrochinon zum Chinon), vom Katalysator abfiltriert und mit verd. HCl angesäuert. Man sättigt mit NaCl und filtriert. Das Filtrat wird dreimal mit Ether extrahiert, die organischen Phasen werden vereinigt und getrocknet (Na_2SO_4). Man filtriert vom Trockenmittel ab und rotiert die Lösung ein: der Rückstand besteht aus MS-reinem Produkt, das durch Umkristallisieren aus Toluol weiter gereinigt werden kann.

Ausbeute: 313 mg (85%)

Schmp. 153-154°C (Lit.¹³³) 155-156°C)

MS: m/e(%) 171(9), 170(100, M^+), 169(16), 168(6), 142(6), 127(12), 124(5),
112(6), 99(35), 96(6), 71(34), 70(10), 69(30), 55(8), 53(13),
43(6), 42(18), 41(7).

Hochaufgelöste MS-Daten: m/e 170.0218 = $C_7H_6O_5$ (M^+)

2,3,5-Trimethoxy-1,4-benzochinon(26)

100 mg 98 werden in Methanol unter Eiskühlung mit einem kleinen Überschuß etherischer Diazomethanlösung umgesetzt. Nach Einengen chromatographiert man an einer Kieselgelsäule (KG 40) mit $CHCl_3/MeOH$ 95:5.

26 wird als orangefarbene Bande zuerst eluiert und fällt aus DMSO in roten Nadeln an.

Ausbeute: 80 mg (75%)

Schmp. 156-157°C (Lit.¹⁹¹) 160-161°C)

MS: Abb.88, S.119

Hochaufgelöste MS-Daten: m/e 198.0526 = $C_9H_{10}O_5$ (M^+)

1H -NMR (100 MHz): Tab.3, S.36

2,5-Dihydroxy-3,6-dimethoxy-1,4-benzochinon(71)

a) Tetrahydroxy-1,4-benzochinon(113)

Die Darstellung erfolgte nach ¹³⁵⁾.

Ansatz: 160 ml 30%ige Lösung von Glyoxal in Wasser

Ausbeute: 3.5 g (6%)

b) Tetramethoxy-1,4-benzochinon(72)

3.4 g 113 werden in Methanol mit etherischer Diazomethanolösung unter Eiskühlung umgesetzt. Nach Umkristallisation aus MeOH erhält man das Produkt in orangeroten Nadeln.

Ausbeute: 3.2 g (70%)

Schmp. 135-137°C (Lit. ¹³⁶⁾ 145°C)

MS: m/e(%) 229(11), 228(100, M⁺), 213(32), 210(6), 199(11), 195(17), 185(22),
183(33), 168(9), 167(10), 165(5), 158(5), 157(60), 129(43), 127(7),
114(10), 99(11), 86(19), 83(13), 69(14), 43(18).

Hochaufgelöste MS-Daten: m/e 228.0630 = C₁₀H₁₂O₆ (M⁺)

c) 2,5-Dihydroxy-3,6-dimethoxy-1,4-benzochinon(71)

Die Darstellung erfolgte nach ¹³⁶⁾.

Ansatz: 1 g 72

Ausbeute: 500 mg 71 (umkristallisiert aus Ethanol)(57%)

Schmp. 234-236°C (Lit. ¹³⁶⁾ 236°C)

MS: m/e(%) 201(10), 200(100, M⁺), 186(6), 185(63), 172(9), 157(16), 155(6),
129(82), 101(38), 99(6), 85(7), 70(6), 69(20), 58(12), 41(8).

Hochaufgelöste MS-Daten: m/e 200.0325 = C₈H₈O₆ (M⁺)

4.3.3. Phenoxazone

4.3.3.1. Allgemeine Arbeitsvorschriften

a) KEHRMANN-Reaktion (in Anlehnung an ^{121,124)})

Ansatzgröße (Beispiel): je ca. 300 mg des Aminophenols und des Benzochinons (2 mmol), 20 ml Wasser, 4 Tropfen konz.HCl.

Das betreffende Aminophenol und das jeweilige Benzochinon werden im Molverhältnis 1:1 in verdünnter Salzsäure gelöst und ca. 10-15 min. am Rückfluß ^{*)} erhitzt. Man kühlt anschließend im Eisbad ab und saugt das angefallene Hydroxyphenoxazon ab. Nachdem mit Eiswasser neutral gewaschen wurde, trocknet man das Phenoxazon i.Vak. über P_2O_5 . Dieses Produkt ist für die weiteren Umsetzungen sauber genug (ca. 90% Reinheit). Zur Aufnahme des Massenspektrums wird ein kleiner Anteil über präparative DC gereinigt: Entwicklung der Platten je nach Polarität der Verbindung mit $CHCl_3/MeOH$ 95:5 bis 8:2.

Ein weiterer (meist geringer) Anteil des entstandenen Phenoxazons kann durch Extraktion des wässrigen Filtrates mit $CHCl_3$ und anschließende chromatographische Reinigung des Extraktes gewonnen werden.

b) Acetylierung

Ca. 10 mg der zu acetylierenden Verbindung werden in 1 ml trockenem Pyridin gelöst und mit 1 ml Acetanhydrid p.a. versetzt. Man läßt über Nacht bei RT stehen, rotiert ein, nimmt in $CHCl_3$ auf und reinigt chromatographisch.

c) Alkylierung mit Diazomethan

Ca. 50 mg des umzusetzenden Phenoxazons werden in 10 ml $CHCl_3$ oder MeOH gelöst (bzw. suspendiert) und unter Eiskühlung portionsweise mit etherischer Diazomethan-Lösung versetzt bis zur vollständigen Umsetzung (DC-Kontrolle). Ausfallende Reaktionsprodukte werden abgesaugt, homogene Reaktionslösungen werden eingeeengt und über DC-Platten gereinigt.

d) Alkylierung mit Alkyljodiden

Ca. 5-10 mg des umzusetzenden Phenoxazons löst (oder suspendiert) man in 2 ml Aceton p.a. und fügt die gleiche Menge trockenes Kaliumcarbonat sowie 4 Tropfen des Alkyljodids (Pasteur-Pipette, ca. 10 mg) zu. Man erhitzt im allgemeinen 12 h am Rückfluß (evtl. kürzer), wobei nach ca. 2 h erneut 1 ml Aceton und 4 Tropfen Alkyljodid zugegeben werden.

*)bzw. suspendiert, homogene Lösung erst beim Erwärmen.

Der Ansatz wird einrotiert, der Rückstand in wenig CHCl_3 aufgenommen, die Lösung filtriert und chromatographiert (präp. DC).

e) Umsetzung von Hydroxyphenoxazonen mit Thionylchlorid (in Anlehnung an¹³⁴⁾)
Ansatzgrößen (Beispiele): 100 mg (5 mg) umzusetzende Substanz, 3 ml (0.5 ml) Thionylchlorid, 100 mg (5 mg) Chloranil, 10 ml (3 ml) Benzol.
Substanz, Thionylchlorid und Chloranil werden in Benzol suspendiert und 10-30 min. am Rückfluß erhitzt. Der Ansatz wird einrotiert, in wenig CHCl_3 aufgenommen, filtriert. Zur Abtrennung des Chloranils und gleichzeitig zur Vortrennung der entstandenen Chlorphenoxazone wird das Filtrat zunächst über eine Kieselgel-Säule chromatographiert (Laufmittel: CHCl_3). Die anschließende Reinigung und Feintrennung der Chlorphenoxazone erfolgt durch präp. DC (Laufmittel: CHCl_3 bzw. $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 99:1).

f) Katalytische Hydrierung von Chlorphenoxazonen

Ca. 10 mg des betreffenden Chlorphenoxazons werden in 2 ml Triethylamin gelöst, mit einer Spatelspitze PtO_2 versetzt und im Kleinautoklaven unter 4 atm. Wasserstoffdruck hydriert. Bedingungen: $40^\circ\text{C}/1\text{ h}$ bzw. $70^\circ\text{C}/3\text{ h}$. Man verdünnt anschließend mit Chloroform und rührt ca. 1 h unter Luftzutritt (Rückoxydation vom Hydroxyphenoxazin zum Phenoxazon). Man filtriert vom Katalysator ab, rotiert die Lösung ein, nimmt in wenig CHCl_3 wieder auf und reinigt mittels präp. DC.

4.3.3.2. unsubstituiertes Phenoxazon(7)

Die Darstellung erfolgte in Anlehnung an⁸²⁾.

In eine Lösung von 400 mg Phenoxazin (2 mmol) in 20 ml 95%igem Ethanol und 4 ml konz. HCl werden bei $+5^\circ\text{C}$ 8 ml einer 30%igen Natriumnitritlösung (35 mmol) zugetropft. Anschließend rührt man im Eisbad weitere 15 min. und dann über Nacht bei RT. Der Ansatz wird zweimal mit je 80 ml CHCl_3 extrahiert, der Extrakt mit ges. Natriumhydrogencarbonatlösung und mit Wasser gewaschen und getrocknet (Natriumsulfat). Nach Abfiltrieren des Trockenmittels rotiert man ein und nimmt in wenig CHCl_3 auf. Nach Säulenchromatographie an 50 g KG 40 mit CHCl_3 und $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ -Gemischen mit zunehmendem MeOH-Gehalt erhält man 320 mg vorgereinigtes Rohprodukt. Zur weiteren Reinigung wird nacheinander an 50 g KG 40 mit $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 98:2, 85 g Sephadex LH-20 mit $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 3:7 und 50 g Merckoge! OR-PVA-500 mit $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 3:7 chromatographiert (DC-Kontrolle mit $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 98:2, $R_f=0.6$, Farbe orange). Man trocknet i.Vak. bei 50°C über P_{205} .

Ausbeute: 105 mg (24%)

Schmp. 203-205°C (aus Wasser) (Lit.⁸²⁾ 205-207°C (Zers.)

GC: $T_D = 195^\circ\text{C}$

MS: Abb. 19, S. 43

$^1\text{H-NMR}$ (100 MHz): Abb. 13, S. 34

UV: $\lambda_{\text{max}} = 444, 345, 265(\text{sh})$ und 246 nm.

4.3.3.3. Michigazon(27) und dessen Strukturbeweis

2,4-Dimethoxy-8-(hydroxymethyl)phenoxazon (Michigazon)(27)

a) 2-Hydroxy-8-hydroxymethyl-4-methoxyphenoxazon(99)

KEHRMANN-Reaktion, Ansatz: je 150 mg 3-Amino-4-hydroxybenzylalkohol(14) und 2,5-Dihydroxy-3-methoxy-1,4-benzochinon(98), 10 ml Wasser, 3 Tropfen konz. HCl, 10 min. Rückfluß.

Das ausgefallene Produkt wird abgesaugt und getrocknet. Reinigung für MS: präp. DC mit $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 8:2 ($R_f = 0.3$).

Ausbeute: 150 mg (63%)

Hochaufgelöste MS-Daten: m/e 273.0632 = $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{NO}_5$ (M^+)

b) 2,4-Dimethoxy-8-(hydroxymethyl)phenoxazon(27)

50 mg 99 werden unter Standardbedingungen mit Diazomethan umgesetzt.

Reinigung des Produktes: KG-Säule mit $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 95:5.

Ausbeute: 30 mg (57%)

Schmp. 212-214°C (natives Michigazon: 211-213°C, vgl. S. 189)

Analyse: $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{NO}_5$ (287.1) Ber. C 62.78 H 4.52 N 4.88

Gef. C 62.84 H 4.70 N 5.04

Die Substanz ist in allen Eigenschaften (DC, MS, $^1\text{H-NMR}$, UV, IR, Misch-Schmp.) mit Michigazon aus S.michiganensis [ü 1074] identisch.

8-Acetoxymethyl-2,4-dimethoxyphenoxazon(39)

10 mg 27 werden unter Standardbedingungen acetyliert. Das entstehende Produkt ist in allen Eigenschaften (DC, MS, $^1\text{H-NMR}$, UV, IR, Misch-Schmp.) mit Acetyl-michigazon identisch (vgl. S. 190).

2-Chlor-8-chlormethyl-4-methoxyphenoxazon(102)

99 wird unter Standardbedingungen mit Thionylchlorid umgesetzt,

Ansatz: 100 mg 99, 100 mg Chloranil, 3 ml SOCl_2 , 8 ml Benzol, 10 min. Rückfluß.

Reinigung: Säule KG 40 mit CHCl_3 liefert 30 mg violettes 102, das anschließend noch über präp. DC ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 99:1, $R_f=0.5$) weiter gereinigt wird.

Ausbeute: 22 mg (19%)

Schmp. 220°C (Zers.), GC: $T_D=242^\circ\text{C}$

MS: m/e(%) 313(13, M^+ für $^{37}\text{Cl}_2$), 312(12), 311(68, M^+ für $^{35}\text{Cl}^{37}\text{Cl}$), 310(23), 309(100, M^+ für $^{35}\text{Cl}_2$), 308(13), 282(13), 281(11), 280(20), 279(12), 276(10), 275(9), 274(28), 273(12), 268(15), 266(24), 265(10), 263(15), 247(6), 246(26), 245(15), 244(55), 233(6), 231(18), 228(8), 216(6), 210(6), 200(6), 174(6), 143(6), 140(27), 115(7), 114(5), 112(5), 89(13), 77(16), 63(11), 53(5), 51(9).

Hochaufgelöste MS-Daten: m/e 308.9963 = $\text{C}_{14}\text{H}_9\text{NO}_3^{35}\text{Cl}_2$ (M^+ für $^{35}\text{Cl}_2$)

$^1\text{H-NMR}$ (270 MHz-FT): δ = 7.80 ppm (1H, d, J=2Hz), 7.60(1H, s), 7.59(1H, dd, J=8Hz und 2Hz), 7.41(1H, d, J=8Hz), 4.66(2H, s), 4.06(3H, s).

2-Chlor-4-methoxy-8-methylphenoxazon(63)

10 mg 102 werden unter Standardbedingungen bei 40°C hydriert. Nach 30 min. ist quantitative Umsetzung zu 63 erfolgt. Reinigung: präp. DC mit $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 99:1 ($R_f=0.5$). Trennung von unumgesetztem 102 ist schwierig, aber durch Mehrfachentwicklung der Platten möglich. Einfacher ist die gaschromatographische Reinigung ($T_D=220^\circ\text{C}$). Farbe: violettrot.

Ausbeute: 8.4 mg (95%)

Schmp. $203-204^\circ\text{C}$

Hochaufgelöste MS-Daten: m/e 275.0356 = $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{NO}_3^{35}\text{Cl}$ (M^+ für ^{35}Cl)

212.0705 = $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{NO}_2$

210.0556 = $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{NO}_2$

$^1\text{H-NMR}$ (180 MHz-FT): δ = 7.58 ppm (2H, breites s), 7.37(1H, dd, J=8Hz und 2Hz), 7.32(1H, d, J=8Hz), 4.05(3H, s), 2.45(3H, s).

UV: λ_{max} = 500, 367 und 261 nm

4-Methoxy-8-methylphenoxazon(30)

10 mg 102 werden unter Standardbedingungen 3 h bei 70°C hydriert.

Neben wenig 63 entsteht als Hauptprodukt 30. Reinigung: präp. DC mit $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 99:1 ($R_f=0.45$) oder gaschromatographisch ($T_D=204^\circ\text{C}$).

Farbe: violett. Ausbeute: 5 mg (65%).

Die Hydrierung von 63 führt unter diesen Bedingungen ebenfalls zu 30.
Schmp. 159-160°C (nach GC-Passage)

MS: Abb.32, S.52

Hochaufgelöste

MS-Daten: m/e 241.0742 = $C_{14}H_{11}NO_3 (M^+)$ 183.0680 = $C_{12}H_9NO$
198.0560 = $C_{12}H_8NO_2$ 167.0733 = $C_{12}H_9N$
195.0694 = $C_{13}H_9NO$ 144.0454 = C_9H_6NO

1H -NMR(180 MHz-FT): δ = 7.51 ppm (1H,s), 7.31(1H,d,J=10Hz), 7.27(2H,s),
6.83(1H,d,J=10Hz), 4.03(3H,s), 2.43(3H,s).
(vgl. Abb.97, S.129)

UV: λ_{max} (lgE) = 258(4.13), 350(4.03) und 490 nm(3.79)

4.3.3.4. Weitere Phenoxazone durch KEHRMANN-Reaktion sowie deren Acetylierungs- und Alkylierungsprodukte

2-Hydroxyphenoxazon(119)

Ansatz: je 50 mg 2-Aminophenol(104) und 2,5-Dihydroxy-1,4-benzochinon(69),
15 min. Rückfluß. Ausfallendes 119 wird abgesaugt, gewaschen und ge-
trocknet. Reinigung: präp. DC mit $CHCl_3/MeOH$ 9:1 ($R_f=0.3$). Farbe: dunkel-
braun.

Ausbeute: 38 mg (50%)

Schmp. 255°C(Zers.) (Lit. ⁸²) 264°C(Zers.)

MS: m/e(%) 213(100, M^+), 185(60), 144(28), 78(15), 77(11), 69(10), 51(15),
50(16).

Hochaufgelöste MS-Daten: m/e 213.0429 = $C_{12}H_7NO_3 (M^+)$

2-Acetoxyphenoxazon(13)

20 mg 119 werden unter Standardbedingungen acetyliert.

Reinigung des entstandenen 13: Säule KG 40 mit $CHCl_3/MeOH$ 98:2 .

Farbe: orange. (DC mit dem gleichen Laufmittel: $R_f=0.62$)

Ausbeute: 14 mg (59%)

Schmp. 229-231°C (Lit. ⁸²) 229-230°C)

MS: m/e(%) 255(7, M^+), 214(15), 213(100), 185(50), 51(10), 50(18), 43(34).

Hochaufgelöste MS-Daten: m/e 255.0527 = $C_{14}H_9NO_4 (M^+)$

2-Hydroxy-8-methylphenoxazon(56)

Ansatz: je 570 mg 2-Amino-p-kresol(105) und 2,5-Dihydroxy-1,4-benzochinon(69), 10 min. Rückfluß. Das dunkelbraun ausfallende 56 wird abgesaugt, gewaschen und getrocknet.

Reinigung: präp. DC mit $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1 ($R_f=0.3$)

Ausbeute: 816 mg (88%)

Schmp.: Zersetzung oberhalb 280°C (Lit. 77c) 300°C (Zers.)

Hochaufgelöste MS-Daten: m/e 227.0586 = $\text{C}_{13}\text{H}_9\text{NO}_3$ (M^+)

2-Methoxy-8-methylphenoxazon(29)

20 mg 56 werden nach Standardvorschrift mit Methyljodid umgesetzt.

Reaktionszeit: 2 h. Reinigung des entstandenen 29: präp. DC mit $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 98:2 ($R_f=0.53$). Farbe: zitronengelb.

Ausbeute: 9 mg (42%)

Schmp. $240-242^\circ\text{C}$ (subl.)

MS: Abb. 20, S. 43

Hochaufgelöste MS-Daten: m/e 241.0734 = $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{NO}_3$ (M^+)

$212.0715 = \text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{NO}_2$

UV: $\lambda_{\text{max}} = 450(\text{sh})$, 384, 250 und 220 nm

2- ^{13}C Methoxy-8-methylphenoxazon(29c)

5 mg 56 werden wie bei 29 beschrieben mit $^{13}\text{CH}_3\text{J}$ (99% ^{13}C) umgesetzt und aufgearbeitet.

MS: Abb. 25, S. 47

2- $^{13}\text{D}_3$ Methoxy-8-methylphenoxazon(29d)

5 mg 56 werden wie bei 29 beschrieben mit CD_3J (99% D) umgesetzt und aufgearbeitet.

MS: Abb. 21, S. 44

2-Hydroxy-8-(hydroxymethyl)phenoxazon(120)

Ansatz: je 50 mg 3-Amino-4-hydroxybenzylalkohol(14) und 2,5-Dihydroxy-1,4-benzochinon(69), 15 min. Rückfluß. Das Produkt wird abgesaugt, gewaschen und getrocknet. Reinigung: präp. DC mit $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 8:2 ($R_f=0.15$). Farbe: schwarzbraun.

Ausbeute: 68 mg (78%)

MS: $m/e(\%)$ 244(16), 243(100, M^+), 242(9), 226(8), 215(13), 214(28), 198(11), 186(24), 144(23), 77(11), 69(10), 51(9), 50(8).

Hochaufgelöste MS-Daten: m/e 243.0526 = $\text{C}_{13}\text{H}_9\text{NO}_4$ (M^+)

2-Acetoxy-8-(acetoxymethyl)phenoxazon

Zur Charakterisierung von 120 wurden ca. 20 mg in üblicher Weise acetyliert und nach Aufarbeitung über präp. DC getrennt ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 95:5). Man erhält mit $R_f=0.2$ ein Monoacetat ($M^+=m/e$ 285) und mit $R_f=0.6$ als Hauptprodukt das Diacetat ($M^+=m/e$ 327). Dieses wird über Merckogel OR-PVA-500 abschließend gereinigt (mit $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 3:7).

Ausbeute: 15 mg

Schmp. 196-199°C

IR: 1780, 1730, 1630 und 1580 cm^{-1}

Analyse: $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{NO}_6$ (327.1) Ber. C 62.40 H 4.00 N 4.28

Gef. C 61.86 H 4.14 N 4.00

Mol.-Masse 327 (MS)

8-Hydroxymethyl-2-methoxyphenoxazon(121)

30 mg 120 werden wie üblich mit Diazomethan umgesetzt.

Reinigung: präp. DC mit $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1, $R_f=0.6$. Farbe: zitronengelb.

Ausbeute: 15 mg (47%)

MS: $m/e(\%)$ 259(6), 258(13), 257(72, M^+), 256(18), 229(17), 228(100), 227(12), 226(6), 211(13), 198(9), 186(7), 170(9), 144(5), 77(9), 65(6), 51(7), 50(12), 39(5).

Hochaufgelöste MS-Daten: m/e 257.0684 = $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{NO}_4$ (M^+)

8-Acetoxyethyl-2-methoxyphenoxazon(20)

14 mg 121 werden unter Standardbedingungen acetyliert. Reinigung des entstandenen 20: Säule KG 40 mit $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 99:1

DC: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 99:1 ($R_f=0.3$) bzw. 95:5 ($R_f=0.7$). Farbe: zitronengelb.

Ausbeute: 8 mg (49%)

Schmp. 240-241°C (nach GC-Passage)

MS: $m/e(\%)$ 301(6), 300(19), 299(100, M^+), 298(13), 271(22), 270(100), 269(13), 256(7), 253(7), 242(6), 240(14), 239(7), 229(5), 228(23), 227(5), 226(8), 212(11), 211(27), 210(16), 198(7), 197(7), 182(7), 169(8), 156(5), 140(7), 78(6), 77(11), 63(7), 51(9), 50(16), 43(32).

Hochaufgelöste MS-Daten: m/e 299.0801 = $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{NO}_5$ (M^+)

$^1\text{H-NMR}$ (180 MHz-FT): Abb. 14, S. 35

IR: 1730, 1620, 1580, 1245, 1175, 870, 815 cm^{-1}

UV: λ_{max} (1gE) = 223(4.51), 250 sh(4.39), 384(4.32) und 440 nm (sh)(4.02)

4,8-Dimethyl-2-hydroxyphenoxazon(58)

Ansatz: 1.2 g 2-Amino-p-kresol(105) und 1.5 g 2,5-Dihydroxy-3-methyl-1,4-benzochinon(92), 100 ml Wasser, 10 Tropfen konz. HCl, 10 min.

Rückfluß. Das Produkt wird abgesaugt, gewaschen und getrocknet.

Ausbeute: 1.55 g (66%)

Reinigung: präp. DC mit $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 95:5 ($R_f=0.24$), Farbe: braun.

Schmp. 253-255⁰C(subl.)

MS: Abb.68,S.98

Hochaufgelöste MS-Daten: m/e 241.0741 = $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{NO}_3$ (M^+)

4,8-Dimethyl-2-methoxyphenoxazon(60)

5 mg 58 werden in wenig Methanol suspendiert und wie üblich mit etherischer Diazomethanolösung umgesetzt. Zunächst bildet sich eine homogene Lösung, anschließend fallen gelbe Flocken des Umsetzungsproduktes aus. Man saugt ab und trocknet: 3 mg DC- und MS-reines 60.

DC: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 98:2 ($R_f=0.53$), Farbe: auf DC-Platte gelborange, in Substanz zitronengelb.

Schmp. 228-229⁰C

MS: Abb.71,S.100

Hochaufgelöste MS-Daten: m/e 255.0891 = $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{NO}_3$ (M^+)

¹H-NMR(180 MHz-FT): δ = 7.50 ppm (1H,breites s), 7.26(2H,breites s), 6.53(1H,s), 3.93(3H,s), 2.43(3H,s), 2.17(3H,s).

4-Ethyl-2-hydroxy-8-methylphenoxazon(59)

Ansatz: je 50 mg 2-Amino-p-kresol(105) und 2,5-Dihydroxy-3-ethyl-1,4-benzochinon(115), 15 min. Rückfluß. Das ausfallende Produkt wird abgesaugt, gewaschen und getrocknet.

Ausbeute: 39 mg (52%)

Reinigung: präp. DC mit $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 95:5 ($R_f=0.3$), Farbe: braun.

MS: Abb.68,S.98

Hochaufgelöste MS-Daten: m/e 255.0896 = $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{NO}_3$ (M^+)

4-Ethyl-2-methoxy-8-methylphenoxazon(61)

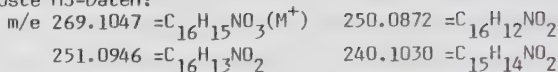
20 mg 59 werden nach Standardvorschrift mit CH_3J umgesetzt. Reaktionszeit: 2 h.

Reinigung: präp. DC mit $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 98:2 ($R_f=0.6$), Farbe: orange.

Ausbeute: 11.8 mg (56%)

MS: Abb. 71, S. 100

Hochaufgelöste MS-Daten:



4-Ethyl-2-[D₃]methoxy-8-methylphenoxazon(61a)

5 mg 59 werden wie unter 61 beschrieben mit CD₃J (99% D) umgesetzt.

MS: Abb. 71, S. 100

1,4-Dimethoxy-2-hydroxy-8-methylphenoxazon(67)

Ansatz: 110 mg 2-Amino-p-kresol(105) und 180 mg 2,5-Dihydroxy-3,6-dimethoxy-1,4-benzochinon(71), 5 h Rückfluß (!).

Der gesamte Ansatz wird eintriert, der Rückstand mit 10 ml CHCl₃/MeOH 95:5 digeriert. Man filtriert und chromatographiert das Filtrat an 50 g Kieselgel 40 mit CHCl₃/MeOH 95:5 und erhält auf diese Weise 53 mg (20%) Rohprodukt.

Reinigung: präp. DC mit CHCl₃/MeOH 95:5 (R_f=0.43), Farbe: braun.

Schmp. 190-191°C

MS: Abb. 82, S. 112

Hochaufgelöste MS-Daten: m/e 287.0799 = C₁₅H₁₃NO₅ (M⁺)
226.0514 = C₁₃H₈NO₃

1,2,4-Trimethoxy-8-methylphenoxazon(68)

10 mg 67 werden nach der allgemeinen Vorschrift mit CH₃J umgesetzt.

Reinigung: präp. DC mit CHCl₃/MeOH 98:2 (R_f=0.6) oder gaschromatographisch. Farbe: braunrot.

Ausbeute: 6.7 mg (64%)

Schmp. 146-147°C UV: λ_{max} = 479, 382 und 252 nm

MS: Abb. 84, S. 115

Hochaufgelöste MS-Daten: m/e 301.0942 = C₁₆H₁₅NO₅ (M⁺)

1,4-Dimethoxy-2-[D₃]methoxy-8-methylphenoxazon(68a)

5 mg 67 werden wie unter 68 beschrieben mit CD₃J (99% D) umgesetzt.

MS: Abb. 84, S. 115

2-Hydroxy-4-methoxyphenoxazon(122)

Ansatz: 220 mg 2-Aminophenol(104) und 340 mg 2,5-Dihydroxy-3-methoxy-1,4-benzochinon(98), 10 min. Rückfluß. Produkt absaugen, waschen und trocknen.

Ausbeute: 285 mg (60%)

Reinigung: Säule KG 40 mit $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 95:5, anschließend präp. DC mit $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1 ($R_f=0.6$). Farbe: rotbraun.

Hochaufgelöste MS-Daten: m/e 243.0528 = $\text{C}_{13}\text{H}_9\text{NO}_4$ (M^+)

2,4-Dimethoxyphenoxazon(38)

100 mg 122 werden nach der allgemeinen Vorschrift mit CH_3J umgesetzt.

Reinigung: Säule KG 40 mit $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 98:2 .

Ausbeute: 59 mg (56%)

Schmp. 192-193°C (nach GC-Passage)

DC: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 98:2 ($R_f=0.53$). Farbe: orangerot.

MS: Abb.37, S.57

Hochaufgelöste MS-Daten: m/e 257.0686 = $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{NO}_4$ (M^+)

2-Hydroxy-4-methoxy-8-methylphenoxazon(66)

Ansatz: 250 mg 2-Amino-p-kresol(105) und 340 mg 2,5-Dihydroxy-3-methoxy-1,4-benzochinon(98), 10 min. Rückfluß. Das Produkt wird abgesaugt, gewaschen und getrocknet. Man erhält 360 mg 66 (70%) mit über 90%iger Reinheit (DC).

Reinigung: präp. DC mit $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1 ($R_f=0.27$), Farbe: braun.

Schmp. 229-231°C

MS: Abb.79, S.109

Hochaufgelöste MS-Daten: m/e 257.0692 = $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{NO}_4$ (M^+)

2,4-Dimethoxy-8-methylphenoxazon(31)

50 mg 66 werden unter Standardbedingungen mit CH_3J umgesetzt.

Reinigung: Säule KG 40 mit $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 98:2 .

Ausbeute: 31.6 mg (60%)

Schmp. 187-188°C (nach GC-Passage)

DC: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 95:5 ($R_f=0.72$), Farbe: orangerot.

MS: Abb.37, S.57

Hochaufgelöste

MS-Daten: m/e 271.0840 = $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{NO}_4$ (M^+)	185.0470 = $\text{C}_{11}\text{H}_7\text{NO}_2$
254.0779 = $^{12}\text{C}_{14}^{13}\text{C}_1\text{H}_{11}\text{NO}_3$ (60%)	170.0602 = $\text{C}_{11}\text{H}_8\text{NO}$
254.0461 = $\text{C}_{14}\text{H}_8\text{NO}_4$ (40%)	157.0524 = $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{NO}$
200.0704 = $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{NO}_2$	129.0576 = $\text{C}_9\text{H}_7\text{N}$

$^1\text{H-NMR}$ (270 MHz-FT): = 7.53 ppm (1H,d,J=2Hz), 7.33(1H,d,J=8Hz),
7.28(1H,dd,J=8Hz und 2Hz), 6.53(1H,s),
4.03(3H,s), 3.93(3H,s), 2.44(3H,s).

2-[D_3]Methoxy-4-methoxy-8-methylphenoxazon($\underline{\underline{31c}}$)

5 mg $\underline{\underline{66}}$ werden wie unter $\underline{\underline{31}}$ beschrieben mit CD_3J (99% D) umgesetzt.

Reinigung: präp. DC mit $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 95:5.

MS: Abb.40,S.62

Hochaufgelöste

MS-Daten: m/e 274.1030 = $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{D}_3\text{NO}_4 (\text{M}^+)$ 255.0866 = $\text{C}_{15}\text{H}_9\text{D}_2\text{NO}_3$
256.0892 = $^{12}\text{C}_{14}^{13}\text{C}_1\text{H}_9\text{D}_2\text{NO}_3$ (20%) 239.0586 = $\text{C}_{14}\text{H}_9\text{NO}_3$
256.0609 = $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{NO}_4$ (80%) 231.0847 = $\text{C}_{13}\text{H}_7\text{D}_3\text{NO}_3$

2-[^{13}C]Methoxy-4-methoxy-8-methylphenoxazon($\underline{\underline{31e}}$)

5 mg $\underline{\underline{66}}$ werden wie unter $\underline{\underline{31}}$ beschrieben mit $^{13}\text{CH}_3\text{J}$ (99% ^{13}C) umgesetzt und aufgearbeitet.

MS: Abb.44,S.69

Hochaufgelöste MS-Daten: m/e 272.0874 = $^{12}\text{C}_{14}^{13}\text{C}_1\text{H}_{13}\text{NO}_4 (\text{M}^+)$
257.0640 = $^{12}\text{C}_{13}^{13}\text{C}_2\text{H}_{10}\text{NO}_4$
256.0609 = $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{NO}_4$

2-Ethoxy-4-methoxy-8-methylphenoxazon($\underline{\underline{53}}$)

5 mg $\underline{\underline{66}}$ werden wie unter $\underline{\underline{31}}$ beschrieben mit $\text{C}_2\text{H}_5\text{J}$ umgesetzt und aufgearbeitet. Man erhält 3 mg $\underline{\underline{53}}$.

Schmp. 179-180°C

DC: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 95:5 ($R_f=0.72$), Farbe: orangerot.

MS: Abb.55,S.84

Hochaufgelöste

MS-Daten: m/e 285.1006 = $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{NO}_4 (\text{M}^+)$ 214.0503 = $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{NO}_3$
256.0970 = $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{NO}_3$ (30%) 183.0684 = $\text{C}_{12}\text{H}_9\text{NO}$
256.0610 = $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{NO}_4$ (70%) 157.0531 = $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{NO}$
227.0587 = $\text{C}_{13}\text{H}_9\text{NO}_3$

2-Hydroxy-4-methoxy-8-nitrophenoxazon($\underline{\underline{123}}$)

Ansatz: je 20 mg 2-Amino-4-nitrophenol($\underline{\underline{106}}$) und 2,5-Dihydroxy-3-methoxy-1,4-benzochinon($\underline{\underline{98}}$), 15 min. Rückfluß. Dabei entsteht zunächst eine homogene Lösung, bevor $\underline{\underline{123}}$ als dunkelbrauner Niederschlag ausfällt. Aufarbeitung wie üblich.

Ausbeute: 16 mg (47%)

Reinigung: präp.DC mit $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 8:2 ($R_f=0.3$), Farbe: braun.

Hochaufgelöste MS-Daten: m/e 288.0376 = $C_{13}H_8N_2O_6$ (M^+)

2,4-Dimethoxy-8-nitrophenoxazon(49)

10 mg 123 werden unter Standardbedingungen mit CH_3I umgesetzt.

Reinigung: präp. DC mit $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 97:3 ($R_f=0.4$) oder 95:5 ($R_f=0.73$).

Farbe: rotbraun. Ausbeute: 5 mg.

Schmp. 249-252°C (subl.)

MS: identisch mit 50 (s.u.)

2-Hydroxy-4-methoxy-7-nitrophenoxazon (124)

Ansatz: je 20 mg 2-Amino-5-nitrophenol(107) und 2,5-Dihydroxy-3-methoxy-
-1,4-benzochinon(98). Die anfängliche Suspension wird beim Rückfluß-
kochen (15 min.) zunächst klar (homogene Lösung), bevor 124 als dunkel-
brauner Niederschlag ausfällt. Nach üblicher Aufarbeitung erhält man
19 mg Produkt (55%).

Reinigung: präp. DC mit $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 8:2 ($R_f=0.25$), Farbe: braun.

MS: m/e(%) 289(16), 288(100, M⁺), 259(10), 258(30), 245(17), 243(9), 242(62), 241(9), 217(7), 214(20), 213(6), 212(12), 200(9), 199(25), 196(6), 184(8), 156(9), 144(5), 143(14), 142(9), 130(5), 128(6), 115(12), 114(7), 101(5), 93(6), 88(6), 77(7), 76(23), 75(21), 74(6), 66(5), 63(12), 53(5), 51(5), 50(7).

Hochaufgelöste

MS-Daten: m/e 288.0380 = $C_{13}H_8N_2O_6 (M^+)$ 242.0334 = $C_{12}H_6N_2O_4$
258.0286 = $C_{12}H_6N_2O_5$ 199.0273 = $C_{11}H_5NO_3$

2,4-Dimethoxy-7-nitrophenoxazon(50)

10 mg 124 werden nach der allgemeinen Vorschrift mit CH_3J umgesetzt.

Reinigung: präp. DC mit $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 95:5 ($R_f=0.71$). Man erhält 5 mg braunrotes Produkt.

Schmp. 280–282°C

MS: Abb. 52, S. 79

Hochaufgelöste

MS-Daten: m/e 302.0536 = C₁₄H₁₀N₂O₆(M⁺) 213.0432 = C₁₂H₇NO₃
 272.0429 = C₁₃H₈N₂O₅ 142.0294 = C₉H₄NO
 241.0373 = C₁₃H₇NO₄ 75.0238 = C₆H₃
 238.0509 = C₁₄H₈NO₃

$^1\text{H-NMR}$ (360 MHz-FT): δ = 8.26 ppm (1H,d,J=2Hz), 8.17(1H,dd,J=9Hz und 2Hz),
7.83(1H,d,J=9Hz), 6.53(1H,s), 4.08(3H,s),
3.96(3H,s).

2,4-Dihydroxy-8-methylphenoxazon(57)

Ansatz: je 1 g 2-Amino-p-kresol(105) und 2,5-Dimethoxy-3-hydroxy-
-1,4-benzochinon(70), 90 ml Wasser, 6 ml konz.HCl, 75 min. Rückfluß.
Aus der anfänglichen Suspension entsteht in der Wärme zunächst eine
homogene Lösung, die sich zunehmend braun verfärbt, bis schließlich
ein Teil des entstandenen 57 schwarzbraun ausfällt. Der gesamte An-
satz wird mehrmals unter jeweils erneuter Zugabe von Methanol zur
Trockne einrotiert (57 löst sich relativ gut in MeOH!). Zur Ent-
fernung restlicher Salzsäure trocknet man i.Vak. über KOH.

Man nimmt in $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 3:7 auf und chromatographiert mit demselben
Laufmittel in zwei Portionen an 85 g Sephadex LH-20. Die weitere
Reinigung erfolgt durch Rechromatographie an LH-20 und anschließende
Trennung an Merckogel OR-PVA-500. Dabei erfolgt Abtrennung von unum-
gesetztem 70 und restlichen Verunreinigungen in kleiner Menge.

Ausbeute: 290 mg (22%) schwarzbraune Kristalle.

DC: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 8:2 ($R_f=0.25$)

MS: Abb.67,S.96

Hochaufgelöste MS-Daten: m/e 243.0537 = $\text{C}_{13}\text{H}_9\text{NO}_4$ (M^+)

4-Hydroxy-2-methoxy-8-methylphenoxazon(62)

120 mg 57 werden nach der allgemeinen Vorschrift mit CH_3J umgesetzt.
Reaktionszeit: 1 h.

Reinigung: präp. DC mit Benzol/E.ester/MeOH 60:40:5 ($R_f=0.3$), Farbe:
violett (auf getrockneter DC-Platte: grün).

Ausbeute: 15 mg (12%)

Schmp. 270-272°C

MS: Abb.74,S.103

Hochaufgelöste MS-Daten: m/e 257.0682 = $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{NO}_4$ (M^+)

$^1\text{H-NMR}$ (360 MHz-FT): δ = 7.56 ppm (1H,d,J=2Hz), 7.36(1H,d,J=8Hz),
7.32(1H,dd,J=8Hz und 2Hz), 6.58(1H,s),
6.46(1H,s), 3.99(3H,s), 2.46(3H,s).

2,4-Dimethoxy-8-methylphenoxazon(31)

5 mg 62 werden wie üblich mit CH_3J umgesetzt. Reaktionszeit: 12 h.
Reinigung: präp. DC mit Benzol/E.ester/MeOH 60:40:3 ($R_f=0.4$), Farbe: orangerot. Man erhält 3 mg Produkt, das in allen Eigenschaften mit 31 (vgl.S.209) übereinstimmt.

2-Methoxy-4-[D₃]methoxy-8-methylphenoxazon(31d)

5 mg 62 werden nach der allgemeinen Vorschrift mit CD_3J (99% D) umgesetzt. Reaktionszeit: 12 h.
Reinigung: präp. DC mit Benzol/E.ester/MeOH 60:40:3 ($R_f=0.4$)
Ausbeute: 3 mg
MS: Abb.40,S.62

Hochaufgelöste

MS-Daten: m/e $274.1028 = \text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{D}_3\text{NO}_4 (\text{M}^+)$ $228.0664 = \text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{NO}_3$
 $256.0920 = \text{C}_{14}^{12}\text{H}_{13}^{13}\text{NO}_3$ $227.0940 = \text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{NO}_2 (65\%)$
 $256.0612 = \text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{NO}_4$ $227.0580 = \text{C}_{13}\text{H}_9\text{NO}_3 (35\%)$

4-Ethoxy-2-methoxy-8-methylphenoxazon(54)

5 mg 62 werden wie üblich mit $\text{C}_2\text{H}_5\text{J}$ umgesetzt. Reaktionszeit: 12 h.
Reinigung: präp. DC mit Benzol/E.ester/MeOH 60:40:3 ($R_f=0.4$) oder gaschromatographisch. Ausbeute: 2.5 mg, Farbe: orangerot.
Schmp. $171-172^\circ\text{C}$
MS: Abb.60,S.88

Hochaufgelöste

MS-Daten: m/e $285.1003 = \text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{NO}_4 (\text{M}^+)$ $227.0584 = \text{C}_{13}\text{H}_9\text{NO}_3$
 $256.0610 = \text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{NO}_4$ $211.0640 = \text{C}_{13}\text{H}_9\text{NO}_2$
 $241.0739 = \text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{NO}_3$ $157.0532 = \text{C}_{10}\text{H}_7\text{NO}$
 $228.0664 = \text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{NO}_3$

4-Hydroxy-2-[D₃]methoxy-8-methylphenoxazon(62a)

40 mg 57 werden nach der allgemeinen Vorschrift mit CD_3J (99% D) umgesetzt. Reaktionszeit: 1 h.
Reinigung: präp. DC mit Benzol/E.ester/MeOH 60:40:5 ($R_f=0.3$)
Ausbeute: 6 mg (14%)
MS: Abb.74,S.103

4-Ethoxy-2-[D₃]methoxy-8-methylphenoxazon(54a)

5 mg 62a werden wie üblich mit C₂H₅J umgesetzt. Reaktionszeit: 12 h.

Reinigung: präp. DC mit Benzol/E.ester/MeOH 60:40:3 (R_F=0.4) oder gaschromatographisch. Ausbeute: 3 mg

MS: Abb.60,S.88

Hochaufgelöste

MS-Daten: m/e 288.1185 = C₁₆H₁₂D₃NO₄ (M⁺) 258.0737 = C₁₄H₈D₂NO₄
 270.0772 = C₁₅H₁₂NO₄ 230.0784 = C₁₃H₈D₂NO₃
 259.0790 = C₁₄H₇D₃NO₄ 228.0641 = C₁₃H₈DNO₃

2-Ethoxy-4-hydroxy-8-methylphenoxazon(125)

40 mg 57 werden nach der allgemeinen Vorschrift mit C₂H₅J umgesetzt.

Reaktionszeit: 1 h.

Reinigung: präp. DC mit Benzol/E.ester/MeOH 60:40:5 (R_F=0.3)

Ausbeute: 7 mg (16%)

Hochaufgelöste MS-Daten: m/e 271.0841 = C₁₅H₁₃NO₄ (M⁺)

2-Ethoxy-4-[D₃]methoxy-8-methylphenoxazon(53a)

5 mg 125 werden wie üblich mit CD₃J (99% D) umgesetzt. Reaktionszeit:

12 h. Reinigung: präp. DC mit Benzol/E.ester/MeOH 60:40:3 (R_F=0.46)

oder gaschromatographisch. Ausbeute: 3 mg

MS: Abb.55,S.84

4.3.3.5. Umsetzungen mit Methan-[D]₁ol

2-[D]Hydroxy-4-methoxy-8-methylphenoxazon(66b)

2 mg 66 werden mit 0.5 ml CH₃OD (99% D) versetzt, anschließend wird die entstandene Lösung unter leichter Erwärmung eingedunstet. Derselbe Vorgang wird noch zweimal wiederholt, der Rückstand erneut in wenig CH₃OD aufgenommen und direkt zur Aufnahme des Massenspektrums verwendet. MS: Abb.80,S.110

Isotopenanalyse der Moleküliongruppe: 50% D₀(m/e 257), 46% D₁(m/e 258),
 4 % D₂(m/e 259).

2-[D]Hydroxy-4-methoxy-8-methyl- [1-D]phenoxazon(66c)

2 mg 66 werden mit 5 ml CH₃OD (99% D) über Nacht am Rückfluß erhitzt.

Die Lösung wird einrotiert und der Rückstand direkt zur Aufnahme des Massenspektrums eingesetzt. MS: Abb.80,S.110

Isotopenanalyse der Moleküliongruppe: 16% D₁(m/e 258), 84% D₂(m/e 259).

2,4-Dimethoxy-8-methyl- [1-D]phenoxazon(31b)

3 mg 66c werden unter Standardbedingungen und Feuchtigkeitsausschluß mit CH_3J umgesetzt. Reaktionszeit: 3 h.

Reinigung: präp. DC mit $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 95:5 ($R_f=0,72$) oder per GC.

MS: Abb.40, S.62

Isotopenanalyse der Moleküliongruppe: 66% D_0 (m/e 271), 34% D_1 (m/e 272).

$^1\text{H-NMR}$: der Integrationswert für das 1-H ist entsprechend der Deuterium-Markierung gegenüber 31 (vgl. S.210: $\delta=6.53$ ppm) vermindert.

1,4-Dimethoxy-2-[D]hydroxy-8-methylphenoxazon(67a)

2 mg 67 werden wie unter 66b beschrieben mit CH_3OD umgesetzt.

MS: Abb.82, S.112

Isotopenanalyse der Moleküliongruppe: 52% D_0 (m/e 287), 48% D_1 (m/e 288).

4.3.3.6. ^{18}O -markierte Phenoxazone

2,4-Dimethoxy-[Carbonyl- ^{18}O]phenoxazon(38a)

und 2-[^{18}O]Hydroxy-4-methoxy-[Carbonyl- ^{18}O]phenoxazon(122a)

10 mg 38 werden in einem 10-ml-Spitzkolben mit 4 ml abs. THF gelöst.

Diese Lösung wird mit 0.1 ml H_2^{18}O (60% ^{18}O) und einer Spatelspitze p-Toluolsulfonsäure (ca. 2 mg) versetzt, der Kolben verschlossen und für 12 h in ein ca. 90°C warmes Ölbad eingetaucht. Nach dem Abkühlen wird die Lösung direkt auf präp. DC-Platten aufgetragen. Man entwickelt mit $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 98:2 und isoliert 5 mg 122a ($R_f=0.2$) neben 2 mg 38a ($R_f=0.5$).

38a: MS siehe Abb.38, S.59

Isotopenanalyse der Moleküliongruppe: 45% $^{18}\text{O}_0$ (m/e 257),
55% $^{18}\text{O}_1$ (m/e 259).

122a: Isotopenanalyse der Moleküliongruppe: 17% $^{18}\text{O}_0$ (m/e 243),
48% $^{18}\text{O}_1$ (m/e 245),
35% $^{18}\text{O}_2$ (m/e 247).

122a wurde auch direkt aus 122 erhalten: 10 mg 122 werden wie oben beschrieben mit H_2^{18}O umgesetzt und aufgearbeitet.

2-[^{18}O]Hydroxy-4-methoxy-8-methyl-[Carbonyl- ^{18}O]phenoxazon(66a)

5 mg 66 werden wie oben beschrieben mit 2 Tropfen H_2^{18}O (60% ^{18}O) in 2 ml abs. THF umgesetzt. Aufarbeitung: präp. DC mit $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 98:2 ($R_f=0.2$). MS: Abb.79, S.109

Isotopenanalyse der Molekülionengruppe:

36% ^{18}O (m/e 257), 47% $^{18}\text{O}_1$ (m/e 259), 17% $^{18}\text{O}_2$ (m/e 261).

2-[^{18}O]Methoxy-4-methoxy-[Carbonyl- ^{18}O]phenoxazon(38c)

15 mg 122a werden wie üblich mit Diazomethan umgesetzt. Reinigung:

präp. DC mit $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 98:2 ($R_f=0.5$)

Ausbeute: 9 mg

Isotopenanalyse der Molekülionengruppe:

18% ^{18}O (m/e 257), 48% $^{18}\text{O}_1$ (m/e 259), 34% $^{18}\text{O}_2$ (m/e 261).

2-[^{18}O]Methoxy-4-methoxyphenoxazon(38b)

7 mg 38c werden wie unter 38a beschrieben (S.215) mit 0.1 ml H_2O (unmarkiert !) in 4 ml THF umgesetzt. Aufarbeitung liefert 1 mg 38b neben 3 mg 122.

38b: MS siehe Abb.39, S.60

Isotopenanalyse der Molekülionengruppe:

43% ^{18}O (m/e 257), 57% $^{18}\text{O}_1$ (m/e 259).

2,4-[$^{18}\text{O}_2$]Dihydroxy-8-methyl-[Carbonyl- ^{18}O]phenoxazon(57a)

11 mg 57 werden in 2 ml abs. THF gelöst. Man setzt 0.2 ml H_2^{18}O (60% ^{18}O) und eine Spatelspitze p-Toluolsulfonsäure zu, verschließt den Kolben und beläßt ihn 20 h im Ölbad (ca. 90°C). Danach verdünnt man mit 6 ml abs. THF und dunstet 1 ml der so erhaltenen Lösung (=1/8) zur Aufnahme des Massenspektrums ein.

Isotopenanalyse der Molekülionengruppe:

14% ^{18}O (m/e 243), 39% $^{18}\text{O}_1$ (m/e 245), 33% $^{18}\text{O}_2$ (m/e 247), 14% $^{18}\text{O}_3$ (m/e 249).

2,4-[$^{18}\text{O}_2$]Dimethoxy-8-methyl-[Carbonyl- ^{18}O]phenoxazon(31f)

Die restlichen 7/8 der unter 57a erhaltenen Lösung werden unter Eiskühlung mit etherischer Diazomethanlösung umgesetzt. Nach beendeter Reaktion (DC-Kontrolle) engt man bei RT weitgehend ein, filtriert durch eine Fritte und reinigt das Filtrat über präp. DC mit $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 95:5 ($R_f=0.72$, 6 mg).

Isotopenanalyse der Molekülionengruppe:

14% ^{18}O (m/e 271), 40% $^{18}\text{O}_1$ (m/e 273), 36% $^{18}\text{O}_2$ (m/e 275), 10% $^{18}\text{O}_3$ (m/e 277).

2,4-[¹⁸O₂]Dimethoxy-8-methylphenoxazon(31g)

und 2-Hydroxy-4-[¹⁸O]methoxy-8-methylphenoxazon(66d)

5 mg 31f werden wie unter 38a beschrieben(S.215) mit 0.1 ml H₂O (unmarkiert!) in 3 ml THF umgesetzt und aufgearbeitet. Man erhält 1 mg 31g neben 2.5 mg 66d.

Isotopenanalyse der Molekülionengruppe:

31g: 35% ¹⁸O₀(m/e 271), 50% ¹⁸O₁(m/e 273), 15% ¹⁸O₂(m/e 275).

66d: 70% ¹⁸O₀(m/e 257), 30% ¹⁸O₁(m/e 259).

2-Methoxy-4-[¹⁸O]methoxy-8-methylphenoxazon(31a)

2 mg 66d werden wie üblich mit Diazomethan umgesetzt. Reinigung:

präp. DC mit CHCl₃/MeOH 95:5 . 1 mg 31a

MS: Abb.39,S.60

Isotopenanalyse der Molekülionengruppe:

70% ¹⁸O₀(m/e 271), 30% ¹⁸O₁(m/e 273).

2-Methoxy-8-methyl-[Carbonyl-¹⁸O]phenoxazon(29a)

5 mg 29 werden wie auf S.215 beschrieben mit H₂¹⁸O (60% ¹⁸O) in abs. THF umgesetzt, jedoch wird der Ansatz bereits nach 5 h (!) aufgearbeitet.

Es fallen 0.7 mg 29a neben 2 mg 56a (s.u.) an. Reinigung von 29a:

präp. DC mit CHCl₃/MeOH 98:2 (zitronengelbe Bande mit R_f=0.53).

MS: Abb.24,S.46

Isotopenanalyse der Molekülionengruppe:

74% ¹⁸O₀(m/e 241), 26% ¹⁸O₁(m/e 243).

2-[¹⁸O]Hydroxy-8-methyl-[Carbonyl-¹⁸O]phenoxazon(56a)

5 mg 29 werden wie unter 29a angegeben umgesetzt, jedoch beträgt die Reaktionszeit jetzt 14 h ! Dabei erfolgt nahezu quantitative Umsetzung zu 56a. Reinigung über präp. DC mit CHCl₃/MeOH 9:1 (braune Bande mit R_f=0.3). Isolierte Menge: 2.5 mg

Isotopenanalyse der Molekülionengruppe:

35% ¹⁸O₀(m/e 227), 47% ¹⁸O₁(m/e 229), 18% ¹⁸O₂(m/e 231).

2-[¹⁸O]Methoxy-8-methyl-[Carbonyl-¹⁸O]phenoxazon(29b)

2 mg 56a werden nach der allgemeinen Vorschrift mit Diazomethan umgesetzt. Reinigung: präp. DC mit CHCl₃/MeOH 98:2 (R_f=0.53 , 1 mg).

MS: Abb.25, S.47

Isotopenanalyse der Moleküliongruppe:

37% ^{18}O (m/e 241), 47% $^{18}\text{O}_1$ (m/e 243), 16% $^{18}\text{O}_2$ (m/e 245).

4-Methoxy-8-methyl-[Carbonyl- ^{18}O]phenoxazon(30a)

5 mg 30 werden wie auf S. 215 angegeben mit H_2^{18}O (60% ^{18}O) in abs. THF umgesetzt. Reaktionszeit: 12 h. Reinigung: präp. DC mit $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 99:1 ($R_f=0.45$) bzw. 98:2 ($R_f=0.6$) oder per GC. Man isoliert 3.5 mg violettes 30a.

MS: Abb.32, S.52

Isotopenanalyse der Moleküliongruppe:

51% ^{18}O (m/e 241), 49% $^{18}\text{O}_1$ (m/e 243).

1,2,4-Trimethoxy-8-methyl-[Carbonyl- ^{18}O]phenoxazon(68b)

5 mg 68 werden wie auf S. 215 angegeben mit H_2^{18}O (60% ^{18}O) in abs. THF umgesetzt. Reaktionszeit: 12 h. Reinigung: präp. DC mit $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 98:2 ($R_f=0.6$) oder per GC. Man isoliert 3.5 mg braunrotes 68b.

MS: Abb.84, S.115

Isotopenanalyse der Moleküliongruppe:

51% ^{18}O (m/e 301), 49% $^{18}\text{O}_1$ (m/e 303).

4.3.3.7. 4-Ethoxy-2-hydroxy-8-methylphenoxazon(126)

20 mg 4-Ethoxy-2-methoxy-8-methylphenoxazon(54) werden in 7 ml THF gelöst, die Lösung mit 0.4 ml H_2O und 4 mg p-Toluolsulfonsäure versetzt und im Bombenrohr 40 h bei 90°C im Ölbad belassen. Nach dem Abkühlen wird einrotiert, in wenig THF aufgenommen, filtriert und das Filtrat über präp. DC gereinigt ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 98:2, braune Bande mit $R_f=0.2$).

Ausbeute: 12 mg (63%)

Schmp. $204-206^\circ\text{C}$

MS: m/e(%) 273(8), 272(19), 271(100, M^+), 270(6), 257(12), 256(53), 253(7), 244(18), 243(82), 242(17), 228(16), 227(46), 225(17), 216(12), 215(73), 214(37), 199(20), 186(15), 174(7), 158(9), 141(7), 130(15), 118(6), 115(8), 104(7), 103(13), 102(6), 100(7), 91(9), 90(6), 89(12), 78(7), 77(17), 70(6), 69(6), 65(8), 63(6), 60(6), 59(8), 58(23), 57(7), 56(7), 55(9), 51(7), 45(7), 44(10), 43(24), 42(16), 41(17).

Hochaufgelöste

MS-Daten: m/e 271.0844 = $C_{15}H_{13}NO_4$ (M^+) 215.0583 = $C_{12}H_9NO_3$
 243.0532 = $C_{13}H_9NO_4$ 214.0503 = $C_{12}H_8NO_3$
 225.0796 = $C_{14}H_{11}NO_2$

4.3.3.8. Chlorphenoxazone durch Umsetzung mit HCl in THF

1-Chlor-2-hydroxy-4-methoxy-8-methylphenoxazon(127)

20 mg 2,4-Dimethoxy-8-methylphenoxazon(31) werden in 8 ml THF gelöst, die Lösung mit 1.5 ml 2N HCl versetzt und im verschlossenen Kolben 10 h bei 80°C im Ölbad belassen. Man rotiert ein, nimmt in wenig THF wieder auf und trennt über präp. DC mit $CHCl_3/MeOH$ 95:5. Neben wenig unumgesetztem Material isoliert man zwei braune Substanzen: mit kleinerem R_F -Wert 5.4 mg 127 (25%) und mit etwas größerem R_F -Wert 3.8 mg 66 (20%).

Weitere Reinigung von 127 an Merckogel OR-PVA-500 mit $CHCl_3/MeOH$ 3:7.

MS: m/e(%) 294(6), 293(39, M^+ für ^{37}Cl), 292(20), 291(100, M^+ für ^{35}Cl),
 290(11), 278(5), 276(7), 273(6), 263(7), 262(12), 261(16), 250(21),
 249(9), 248(63), 247(31), 246(16), 245(94), 239(6), 238(34),
 235(8), 234(6), 233(21), 220(11), 219(5), 217(10), 192(7), 170(6),
 164(8), 157(9), 145.5(6), 129(6), 128(12), 105(6), 104(9), 102(10),
 101(8), 93(6), 90(8), 89(18), 78(7), 77(16), 65(8), 63(9), 57(7),
 51(10), 44(6), 43(7), 41(7), 39(10).

Hochaufgelöste MS-Daten: m/e 291.0296 = $C_{14}H_{10}NO_4$ ^{35}Cl (M^+ für ^{35}Cl)

1-Chlor-2,4-dimethoxy-8-methylphenoxazon(51)

3 mg 127 werden wie üblich mit Diazomethan umgesetzt. Reinigung: präp.

DC mit $CHCl_3/MeOH$ 98:2 ($R_F=0.7$). 2 mg violettrote Substanz.

Schmp. 172-174°C

MS: Abb. 53, S. 81

Hochaufgelöste MS-Daten: m/e 305.0449 = $C_{15}H_{12}NO_4$ ^{35}Cl (M^+ für ^{35}Cl)

1H -NMR (360 MHz-FT): δ = 7.69 ppm (1H, d, J=2Hz), 7.34 (1H, dd, J=8Hz und 2Hz),
 7.31 (1H, d, J=8Hz), 4.19 (3H, s), 4.00 (3H, s),
 2.43 (3H, s).

1-Chlor-2-hydroxy-4-methoxy-7-nitrophenoxazon(128)

20 mg 2,4-Dimethoxy-7-nitrophenoxazon(50) werden wie unter 127 angegeben umgesetzt und aufgearbeitet. Man isoliert 5.3 mg 128 (25%, kleinerer R_F -Wert) neben 3.9 mg 124 (20%, größerer R_F -Wert).

Hochaufgelöste MS-Daten: m/e 321.9987 = $C_{13}H_7N_2O_6$ ^{35}Cl (M^+ für ^{35}Cl)

1-Chlor-2,4-dimethoxy-7-nitrophenoxazon(52)

3 mg 128 werden nach der allgemeinen Vorschrift mit Diazomethan umgesetzt. Reinigung des Produktes: präp. DC mit $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 98:2. Man erhält 1.5 mg

rotbraunes 52 mit $R_f=0.7$.

Schmp. $251-253^\circ\text{C}$

MS: Abb.54, S.82

Hochaufgelöste MS-Daten: m/e 336.0145 = $\text{C}_{14}\text{H}_9\text{N}_2\text{O}_6^{35}\text{Cl}$ (M^+ für ^{35}Cl)

4.3.3.9. Chlorphenoxazone durch Umsetzung mit Thionylchlorid und deren katalytische Hydrierung

2-Chlor-1,4-dimethoxy-8-methylphenoxazon(129)

20 mg 1,4-Dimethoxy-2-hydroxy-8-methylphenoxazon(67) werden unter Standardbedingungen mit Thionylchlorid umgesetzt. Reaktionszeit: 10 min.

Reinigung: präp. DC mit $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 98:2 ($R_f=0.7$, braunviolett).

Ausbeute: 5 mg (24%)

Schmp. $165-167^\circ\text{C}$

Hochaufgelöste MS-Daten: m/e 305.0450 = $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{NO}_4^{35}\text{Cl}$ (M^+ für ^{35}Cl)

1,4-Dimethoxy-8-methylphenoxazon(46)

4 mg 129 werden unter Standardbedingungen hydriert ($70^\circ\text{C}/3\text{ h}$).

Reinigung: präp. DC mit $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 95:5 ($R_f=0.7$, violett) oder per GC.

Man isoliert 2.5 mg 46.

Schmp. $216-218^\circ\text{C}$

MS: Abb.48, S.74

Hochaufgelöste MS-Daten: m/e 271.0847 = $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{NO}_4$ (M^+)

UV: λ_{max} = 487, 360, 258 und 220(sh) nm

2-Chlor-4-methoxy-8-methylphenoxazon(63),

1,2-Dichlor-4-methoxy-8-methylphenoxazon(64),

2,7-Dichlor-4-methoxy-8-methylphenoxazon(65) und

1,2,7-Trichlor-4-methoxy-8-methylphenoxazon(130)

100 mg 2-Hydroxy-4-methoxy-8-methylphenoxazon(66) werden unter Standardbedingungen mit Thionylchlorid umgesetzt. Reaktionszeit: a) 10 min., b) 30 min.

Reinigung zunächst über Säule KG 40 (50g) mit CHCl_3 (DC-Kontrolle mit $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 99:1). Dabei erfolgt zunächst Elution von 130 (braunviolett), gefolgt von einem Gemisch aus 64 (violett) und 65 (rostrot). Zum Schluß wird 63 (violettrot) eluiert. Weitere Reinigung durch Rechromatographie

der einzelnen Fraktionen und durch abschließende Feintrennung über präp. DC mit $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 99:1. Hierbei werden auch 64 und 65 voneinander getrennt (R_f -Werte: 63: 0.19, 64: 0.26, 65: 0.21, 130: 0.32).

Ausbeute: 63: 21 mg (20%) (10min.) bzw. 4 mg (4%) (30min.)

64: 3 mg (2.5%) " " 14 mg (11.5%) "

65: 3 mg (2.5%) " " 12 mg (10%) "

130: 0 mg (0%) " " 10 mg (7.5%) "

63: Schmp. 203-204°C

MS: Abb.78, S.107

Hochaufgelöste MS-Daten: m/e 275.0343 = $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{NO}_3^{35}\text{Cl}$ (M^+ für ^{35}Cl)

$^1\text{H-NMR}$ (180MHz-FT): δ = 7.58 ppm (2H, breites s), 7.37(1H, dd, J=8Hz u. 2Hz), 7.32(1H, d, J=8Hz), 4.05(3H, s), 2.45(3H, s).

64: Schmp. 208-209°C

MS: Abb.78, S.107

Hochaufgelöste MS-Daten: m/e 308.9963 = $\text{C}_{14}\text{H}_9\text{NO}_3^{35}\text{Cl}_2$ (M^+ für $^{35}\text{Cl}_2$)

$^1\text{H-NMR}$ (180MHz-FT): δ = 7.73 ppm (1H, d, J=2 Hz), 7.42(1H, dd, J=8Hz u. 2Hz), 7.33(1H, d, J=8Hz), 4.05(3H, s), 2.47(3H, s).

65: Schmp. 214-216°C

MS: Abb.78, S.107

Hochaufgelöste MS-Daten: m/e 308.9957 = $\text{C}_{14}\text{H}_9\text{NO}_3^{35}\text{Cl}_2$ (M^+ für $^{35}\text{Cl}_2$)

$^1\text{H-NMR}$ (180MHz-FT): δ = 7.63 ppm (1H, s), 7.57(1H, s), 7.45(1H, s), 4.05(3H, s), 2.45(3H, s).

130: Schmp. 262-264°C (Zers.)

MS: m/e (%) 349(7, M^+ für $^{37}\text{Cl}_3$), 348(8), 347(42, M^+ für $^{35}\text{Cl}^{37}\text{Cl}_2$), 346(24), 345(100, M^+ für $^{35}\text{Cl}_2^{37}\text{Cl}$), 344(32), 343(96, M^+ für $^{35}\text{Cl}_3$), 342(13), 318(8), 317(9), 316(28), 315(17), 314(29), 313(14), 310(7), 309(11), 308(10), 307(13), 304(16), 303(7), 302(48), 301(13), 300(50), 299(18), 297(18), 289(10), 287(25), 285(27), 282(10), 280(25), 279(7), 278(21), 211(13), 210(9), 209(19), 208(6), 178(10), 176(6), 174(17), 138(7), 127(6), 126(7), 125(8), 124(16), 123(12), 113(11), 112(7), 111(32), 102(20), 99(6), 90(6), 89(34), 88(7), 87(12), 85(6), 83(8), 77(8), 75(8), 72(12), 64(6), 63(21), 62(8), 55(7), 51(10), 45(10), 44(19), 43(15), 42(17), 39(11), 36(10).

Hochaufgelöste MS-Daten: m/e 342.9562 = $C_{14}H_8NO_3^{35}Cl_3$ (M^+ für $^{35}Cl_3$)
 1H -NMR (180MHz-FT): δ = 7.75 ppm (1H,s), 7.43(1H,s), 4.03(3H,s),
 2.45(3H,s).

2-Chlor-4,8-dimethylphenoxazon(131) ,
1,2-Dichlor-4,8-dimethylphenoxazon(132) ,
2,7-Dichlor-4,8-dimethylphenoxazon(133) und
1,2,7-Trichlor-4,8-dimethylphenoxazon(134)

100 mg 4,8-Dimethyl-2-hydroxyphenoxazon(58) werden in gleicher Weise
 wie 66 (s.o.) mit Thionylchlorid umgesetzt und aufgearbeitet. Feintren-
 nung über präp. DC mit $CHCl_3$ (R_f -Werte: 131: 0.26, 132: 0.40(violett),
133: 0.31(orangerot), 134: 0.47(hellbraunrot)).

Ausbeute: 131: 23 mg (21%) (10 min.) bzw. 2 mg (2%) (30 min.)
132: 2 mg (1.5%) " " 10 mg (8%) "
133: 4 mg (3%) " " 12 mg (10%) "
134: 0 mg (0%) " " 11 mg (8%) "

131: MS: m/e (%) 262(6), 261(38, M^+ für ^{37}Cl), 260(20), 259(100, M^+ für ^{35}Cl),
 258(7), 231(10), 230(8), 197(7), 196(49), 195(6), 168(12),
 167(9), 129.5(7), 77(7), 75(8), 63(7), 51(9), 39(6).

Hochaufgelöste MS-Daten: m/e 259.0405 = $C_{14}H_{10}NO_2^{35}Cl$ (M^+ für ^{35}Cl)

132: Schmp. 199-201°C

MS: m/e (%) 297(15, M^+ für $^{37}Cl_2$), 296(12), 295(70, M^+ für $^{35}Cl^{37}Cl$),
 294(20), 293(100, M^+ für $^{35}Cl_2$), 292(5), 267(15), 266(10),
 265(22), 264(10), 258(7), 232(11), 231(7), 230(34), 202(9),
 167(7), 166(7), 146.5(7), 89(6), 77(7), 75(7), 65(7), 51(7).

Hochaufgelöste MS-Daten: m/e 293.0006 = $C_{14}H_9NO_2^{35}Cl_2$ (M^+ für $^{35}Cl_2$)

1H -NMR (180MHz-FT): δ = 7.68 ppm (1H,d, J=2Hz), 7.37(1H,dd, J=8Hz u. 2Hz),
 7.25(1H,d, J=8Hz), 2.45(3H,s), 2.17(3H,s).

133: Schmp. 210-211°C

MS: m/e (%) 297(13, M^+ für $^{37}Cl_2$), 296(11), 295(70, M^+ für $^{35}Cl^{37}Cl$),
 294(19), 293(100, M^+ für $^{35}Cl_2$), 292(5), 265(7), 232(12),
 231(7), 230(37), 204(5), 202(15), 167(6), 166(7), 146.5(6),
 77(6), 75(11), 63(8), 51(9).

Hochaufgelöste MS-Daten: m/e 293.0010 = $C_{14}H_9NO_2^{35}Cl_2$ (M^+ für $^{35}Cl_2$)

$^1\text{H-NMR}$ (180MHz-FT): δ = 7.58 ppm (1H,s), 7.53(1H,s), 7.35(1H,s),
2.43(3H,s), 2.15(3H,s).

134: Schmp. 267-269°C(Zers.)

MS: m/e(%) 333(6, M^+ für $^{37}\text{Cl}_3$), 332(6), 331(34, M^+ für $^{35}\text{Cl}^{37}\text{Cl}_2$),
330(18), 329(100, M^+ für $^{35}\text{Cl}_2^{37}\text{Cl}$), 328(18), 327(98, M^+ für
 $^{35}\text{Cl}_3$), 303(8), 302(6), 301(23), 300(10), 299(23), 298(7),
294(7), 292(8), 266(24), 265(10), 264(37), 263(6), 238(8),
236(13), 229(6), 228(6), 201(8), 200(8), 166(7), 164.5(6),
164(6), 111(7), 110(6), 109(10), 89(7), 84(6), 77(9), 75(16),
74(7), 63(11), 51(10), 39(8), 36(7).

Hochaufgelöste MS-Daten: m/e 326.9624 = $\text{C}_{14}\text{H}_8\text{NO}_2^{35}\text{Cl}_3(\text{M}^+ \text{ für } ^{35}\text{Cl}_3)$

$^1\text{H-NMR}$ (180MHz-FT): δ = 7.75 ppm (1H,s), 7.40(1H,s), 2.46(3H,s),
2.17(3H,s).

2-Chlor-8-(chlormethyl)phenoxazon(135)

30 mg 2-Hydroxy-8-(hydroxymethyl)phenoxazon(120) werden wie üblich mit
Thionylchlorid umgesetzt. Reaktionszeit: 10 min. Reinigung: präp. DC
mit $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 98:2 ($R_f=0.65$, orange).

Ausbeute: 8.6 mg (25%)

Schmp. 200-201°C

Hochaufgelöste MS-Daten: m/e 278.9850 = $\text{C}_{13}\text{H}_7\text{NO}_2^{35}\text{Cl}_2(\text{M}^+ \text{ für } ^{35}\text{Cl}_2)$

$^1\text{H-NMR}$ (180MHz-FT): δ = 7.82 ppm (1H,d,J=2Hz), 7.67(1H,s),
7.59(1H,dd,J=8Hz und 2Hz), 7.35(1H,d,J=8Hz),
6.46(1H,s), 4.65(2H,s).

4,8-Dimethylphenoxazon(55)

5 mg 131 werden unter Standardbedingungen hydriert (70°C/3 h).

Reinigung: präp. DC mit $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 98:2 ($R_f=0.61$); Farbe: rotviolett.

Man isoliert 2.4 mg 55.

Schmp. 168-169°C

MS: Abb.65, S.95

Hochaufgelöste

MS-Daten: m/e 225.0789 = $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{NO}_2(\text{M}^+)$ 168.0812 = $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{N}$
197.0836 = $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{NO}$ 154.0655 = $\text{C}_{11}\text{H}_8\text{N}$
196.0759 = $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{NO}$

2-Chlor-8-methylphenoxazon(136)

5 mg 135 werden wie üblich hydriert (40°C/1 h). Reinigung: präp. DC
mit $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 98:2 ($R_f=0.6$). Man isoliert 3 mg 136.

Hochaufgelöste MS-Daten: m/e 245.0241 = $C_{13}H_8NO_2^{35}Cl$

8-Methylphenoxazon(28)

3 mg 136 werden unter Standardbedingungen hydriert (70°C/3 h).

Reinigung: präp. DC mit $CHCl_3/MeOH$ 98:2 ($R_F=0.55$, 1.2 mg).

Schmp. 201-203°C (Lit.^{76d}) 204-205°C)

MS: Abb.20,S.43

Hochaufgelöste MS-Daten: m/e 211.0637 = $C_{13}H_9NO_2(M^+)$

4.3.3.10. 2,4-Dimethoxy-3-hydroxy-8-methylphenoxazin(48)

Eine Lösung von 4 mg 2,4-Dimethoxy-8-methylphenoxazon(31) in 2 ml Methanol wird auf 50°C erwärmt und so lange mit Ascorbinsäure versetzt (vgl.Lit.¹⁹²), bis die anfangs rote Lösung farblos geworden ist. Man engt ein und verwendet den Rückstand unmittelbar zur Aufnahme des Massenspektrums. An der Luft erfolgt rasche Rückoxydation zum Ausgangsprodukt!

MS: Abb.51,S.77

Hochaufgelöste MS-Daten: m/e 273.1007 = $C_{15}H_{15}NO_4$

4.3.3.11. 1,2-Dimethoxy-8-methylphenoxazon(47)

a) 2-Amino-1-methoxy-8-methylphenoxazon(138) und

2-Amino-1,9-dimethoxyphenoxazon(142)

Es wurde eine Arbeitsvorschrift nach ¹⁹³ auf unser Syntheseproblem übertragen:

800 mg 2-Amino-3-methoxyphenol(137)(5.8 mmol) und 710 mg 2-Amino-p-kresol (105)(5.8 mmol) werden im 2-l-Dreihalskolben in 1.4 l $MeOH/H_2O$ 1:1 gelöst. Man löst 14 g Kaliumhexacyanoferrat(III) zu und rührt den Ansatz 3 h bei RT, wobei man mit 2N NaOH stets auf pH 7.2 hält (Tropftrichter, Glaselektrode).

Der Ansatz wird anschließend dreimal mit $CHCl_3$ extrahiert, der Extrakt über Na_2SO_4 getrocknet, einrotiert, in $CHCl_3/MeOH$ 95:5 aufgenommen und an 200 g Kieselgel MN 60 mit demselben Laufmittel chromatographiert (DC-Kontrolle mit $CHCl_3/MeOH$ 9:1). Zunächst wird eine dunkelbraune Bande eluiert, die 138 und 142 enthält; anschließend erfolgt Elution einer gelben Bande, die nicht näher untersucht wurde.

Das dunkelbraune Rohprodukt (450 mg) wird an 100 g Kieselgel MN 60 mit Benzol/E.ester/MeOH 60:40:1 chromatographiert. Dabei Auftrennung in

zwei braune Banden: zuerst wird 138 eluiert (137 mg = 9%), anschließend 142 (94 mg = 12%). Evtl. nochmalige Reinigung der getrennten Komponenten über präp. DC mit $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 95:5 (R_f -Werte: 138: 0.67, gelbbraun, 142: 0.63, braun).

138: Schmp. 218-220°C

MS: m/e(%) 257(15), 256(100, M^+), 255(5), 241(8), 228(7), 227(7), 226(8), 214(10), 213(21), 211(5), 210(5), 186(14), 185(9), 158(15), 128(9), 77(9).

Hochaufgelöste

MS-Daten: m/e 256.0845 = $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_3(M^+)$ 185.0716 = $\text{C}_{11}\text{H}_9\text{N}_2\text{O}$
 213.0670 = $\text{C}_{12}\text{H}_9\text{N}_2\text{O}_2$ 158.0610 = $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{NO}$
 186.0556 = $\text{C}_{11}\text{H}_8\text{NO}_2$

142: Schmp. 227-229°C

MS: m/e(%) 273(15), 272(100, M^+), 271(6), 257(22), 254(5), 230(8), 229(23), 227(6), 226(8), 212(5), 202(13), 201(6), 174(7), 159(8), 136(5).

Hochaufgelöste MS-Daten: m/e 272.0793 = $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4(M^+)$

b) 2-Hydroxy-1-methoxy-8-methylphenoxazon(139)

50 mg 138 werden nach Zusatz von 5 ml 50%iger Essigsäure über Nacht am Rückfluß erhitzt (vgl. Lit.¹²⁷). Man rotiert den Ansatz ein und reinigt das entstandene Produkt über präp. DC mit $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 8:2 ($R_f=0.3$).

Ausbeute: 5.5 mg (11%)

Hochaufgelöste MS-Daten: m/e 257.0693 = $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{NO}_4(M^+)$

c) 1,2-Dimethoxy-8-methylphenoxazon(47)

4 mg 139 werden wie üblich mit Diazomethan umgesetzt. Reinigung über präp. DC mit $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 95:5 ($R_f=0.73$, orange) oder per GC. man isoliert 2 mg 47.

Schmp. 146-147°C

MS: Abb. 48, S. 74

Hochaufgelöste MS-Daten: m/e 271.0848 = $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{NO}_4(M^+)$

$^1\text{H-NMR}$ (180 MHz-FT): δ = 7.66 ppm (1H, d, J=2 Hz), 7.35 (1H, d, J=8 Hz), 7.25 (1H, dd, J=8 Hz und 2 Hz), 6.18 (1H, s), 4.11 (3H, s), 4.08 (3H, s), 2.43 (3H, s).

UV: λ_{max} = 471(sh), 388, 247 und 219 nm

4.4. Thermolyse von 2,4-Dimethoxy-8-methylphenoxazon(31)

Es wurde die in Abb.124 wiedergegebene Apparatur gebaut und verwendet;

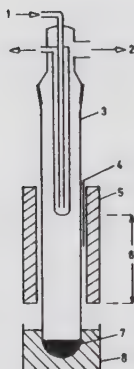


Abb.124: Thermolyse-apparatur(Erklärung im Text)

Das Quarzrohr (3)^{*)} wird mit der zu thermolysierenden Substanz (7) beschickt und auf ca. 3×10^{-2} Torr evakuiert. Durch Eintauchen in ein ca. 180°C heißes Ölbad (8) wird die Substanz langsam in die Reaktionszone (6) hineinsublimiert; die Thermolyseprodukte kondensieren auf den Kühlfinger, dessen Temperatur auf -20°C gehalten wird (1). Die Temperatur im Innern des Ofens (5) wird mit einem Thermoelement (Ni/NiCr) gemessen (4).

Bei einer Ofentemperatur von 500°C und einer Länge der Reaktionszone (6) von 17 cm wurden 50 mg 31 eingesetzt und bis auf geringe Rückstände sublimiert. Die am Kühlfinger kondensierten Substanzen wurden nach dem Belüften der Apparatur mit CHCl_3 und MeOH gelöst und chromatographisch getrennt. Neben 9 mg unumgesetztem

31 erhielten wir im wesentlichen 2 Hauptthermolyseprodukte:

- 17 mg 62 (Ausbeute bezogen auf eingesetztes 31: 36%), das in allen geprüften Eigenschaften mit dem synthetischen Material übereinstimmt (vgl.S.212).
- 15 mg einer sehr schwerflüchtigen Substanz mit dem Molgewicht 442 (Feld-desorptionsmassenspektrum), die bisher noch nicht näher untersucht wurde.

Abtrennung von "MG 442" von 31 und 62 über Merckogel OR-PVA-500 mit $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 3:7. Trennung von 31 und 62 über präp. DC mit $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 97:3.

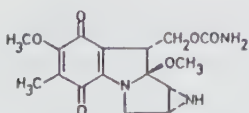
*) Innendurchmesser 20 mm, Länge 45 cm

5. ZUSAMMENFASSUNG

Ausgangspunkt unserer Untersuchungen war die von Tübinger Mikrobiologen gemachte Beobachtung, daß Extrakte einer Kulturlösung von Streptomyces michiganensis* in Abhängigkeit von den Fermentationsbedingungen das Wachstum von Bacillus subtilis auf definiertem Nährmedium unterschiedlich stark hemmen: Dabei wurde festgestellt, daß hohe antibiotische Aktivität mit der Produktion einer violetten Farbkomponente parallel lief; je niedriger die Aktivität lag, umso deutlicher trat die Bildung einer anderen, roten Farbkomponente in den Vordergrund. Da zu vermuten war, daß die Pigmente mit der antibiotischen Wirkung der Extrakte im Zusammenhang stehen, war zunächst die Aufgabe gestellt, diese Substanzen in reiner Form zu isolieren und ihre Strukturen aufzuklären.

Die Rohextrakte erwiesen sich als komplex zusammengesetzte Substanzgemische, welche die Pigmente nur in geringen Konzentrationen enthielten. Unter Anwendung säulen- und dünnschichtchromatographischer Verfahren gelang die Isolierung eines roten und eines violetten Reinpigmentes, wobei die extreme Instabilität des letzteren trotz schonender Aufarbeitung des Rohmaterials zu hohen Substanzverlusten führte: Es standen daher nur 0.5 mg Reinsubstanz für die Strukturermittlung dieser Verbindung zur Verfügung.

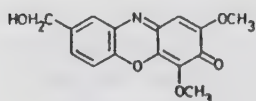
Das violette Pigment wurde als Träger der ausgeprägten antibiotischen Aktivität identifiziert: Noch in hoher Verdünnung wird im Plattendiffusionstest das Wachstum von Bacillus subtilis gehemmt. Elektronen- und Felddesorptionsmassenspektrometrie lieferten die wesentlichen Informationen zur Strukturermittlung: Es handelt sich um Mitomycin A (3), ein bisher nur in wenigen Streptomyces-Stämmen (und ausschließlich dort) aufgefundenes Antibiotikum⁶⁸⁾ mit Strukturmerkmalen, die für Stoffwechselprodukte eines Mikroorganismus ungewöhnlich sind (Aziridinring, Pyrrolizinringsystem).



3 (absol. Konfig.⁶⁹⁾)

* Stamm Tü 1074 der Tübinger Stammsammlung

Das rote Pigment war antibiotisch inaktiv. Im Zuge der Strukturermittlung, für die 30 mg Reinsubstanz zur Verfügung standen, erwies es sich als



27

2,4-Dimethoxy-8-(hydroxymethyl)phenoxazon (27), eine bisher nicht beschriebene Verbindung, der wir den Namen "Michigazon" gegeben haben. Die Strukturaufklärung stützt sich auf spektroskopische Untersuchungen am genuinen Molekül sowie geeigneten Deri-

vaten und Abbauprodukten. Zur eindeutigen Festlegung der Position der Substituenten am chinoiden Ring C war die Analyse der NMR-spektroskopischen Daten von Vergleichsverbindungen erforderlich, die zu diesem Zweck synthetisiert wurden. Die für Michigazon abgeleitete Struktur konnte durch Synthese des Naturstoffes bestätigt werden.

Phenoxazone sind wie Mitomycine als Stoffwechselprodukte von Actinomyceten bekannt^{126,146-149}). Im Gegensatz zu Michigazon weisen die bereits bekannten Phenoxazone natürlicher Herkunft eine Aminofunktion am C-2 auf. Die besonderen Strukturparameter von Michigazon sowie das von uns erstmalig beobachtete Vorkommen eines Mitomycins und eines Phenoxazons als Co-Metaboliten desselben Streptomyces-Stammes erscheinen aus biogenetischer Sicht interessant und werden unter diesem Gesichtspunkt diskutiert.

Den Anstoß zu weiteren Arbeiten gab die Beobachtung einer ungewöhnlichen Fragmentierungsreaktion beim MS-Zerfall von Michigazon: Die ausgeprägte Wasserabspaltung aus dem Molekülion war aufgrund der Struktur des Naturstoffes unerwartet. Anhand der Massenspektren weiterer, zu diesem Zweck gezielt synthetisierter Phenoxazone wurde dieser Prozeß als besonderes Charakteristikum einer 2,4-Dimethoxy-Substitution erkannt.

Durch den Einsatz spezifisch ²H- und ¹⁸O-markierter 2,4-Dimethoxy-phenoxazone gelang massenspektrometrisch die eindeutige Festlegung der Herkunft der in das eliminierte Wassermolekül eingebauten Atome: Besonders überraschend und in der Literatur ohne Beispiel ist die spezifische Beteiligung des Ethersauerstoffatoms der Methoxygruppe an C-2 an einer so ausgeprägten Fragmentierungsreaktion.

für den mechanistischen Ablauf dieser durch komplizierte Umlagerungen auf der Stufe des Moleküliions gekennzeichneten ungewöhnlichen Zerfallsreaktion arbeiten wir aufgrund unserer experimentellen Ergebnisse einen Vorschlag aus (S.67), der im Hinblick auf die Formulierung anderer strukturell unerwarteter Fragmentierungsreaktionen in der Literatur kritisch diskutiert wird. Der von uns postulierte Mechanismus fordert das Vorliegen bestimmter struktureller Randbedingungen als Voraussetzung für den Ablauf der Reaktion: Die experimentelle Überprüfung anhand weiterer geeignet substituierter Phenoxazone führt zu einer vollen Bestätigung unserer Hypothese.

Die erweiterte Untersuchung des MS-Zerfalles an einer größeren Anzahl ausgewählter Phenoxazone, die speziell für diesen Zweck dargestellt wurden, geschah in der Absicht, die bereits genannten Ergebnisse durch Erarbeitung systematischer Einblicke in die Strukturabhängigkeit der massenspektrometrischen Fragmentierung von Phenoxazonen in einen größeren Zusammenhang einzuordnen. Neben spezifisch ^2H -, ^{13}C - und ^{18}O -markierten Verbindungen wurden insbesondere hochaufgelöste Messungen und metastabile Signale zur Interpretation der Spektren herangezogen. Bis auf wenige Ausnahmen sind die untersuchten Phenoxazone bisher nicht beschrieben (vgl. Tab.12, S.160 ff). Im Zuge dieser Studien stießen wir auf zwei weitere ungewöhnliche Fragmentierungsreaktionen:

1. Der MS-Zerfall von 2-Methoxyphenoxazonen ist durch den ausgeprägten Verlust eines CHO -Radikals aus dem Moleküliion gekennzeichnet. Durch Isotopenmarkierung konnten wir den Nachweis erbringen, daß sämtliche in das eliminierte Radikal eingebauten Atome der Methoxyfunktion entstammen. Ein Parallellfall mit vergleichbar hoher Intensität des entstehenden Fragmentions ist in der Literatur unbekannt. Wir erarbeiten einen Fragmentierungsmechanismus, der den bevorzugten Ablauf dieser Reaktion bei 2-Methoxyphenoxazonen erklärt (S.49).
2. Die Massenspektren von 2-Hydroxy-4-methoxyphenoxazonen und 4-Hydroxy-2-methoxyphenoxazonen sind durch ein intensives Fragmention bei m/z 46 charakterisiert. Wir konnten Argumente für eine einstufige Bildung dieser Fragmente durch Eliminierung von Ameisensäure aus den Moleküliionen gewinnen und diskutieren entsprechende Fragmentierungsmechanismen (S.105 u. 109).

Für die meisten der untersuchten Phenoxazone werden MS-Fragmentierungsschemata, die die Hauptzerfallswege beinhalten, ausgearbeitet. In diesem Zusammenhang wird das früher publizierte Zerfallsschema für den unsubstituierten Grundkörper⁵⁰⁾ einer kritischen Betrachtung unterzogen. Die Beziehungen zwischen Änderungen im Substitutionsmuster und korrespondierenden Veränderungen des massenspektrometrischen Fragmentierungsverhaltens werden aufgezeigt und ausführlich diskutiert. Als Resultat dieser systematischen Studie legen wir eine Korrelations-tabelle vor (Tab.13, S.175 ff), die es dem Analytiker ermöglicht, Aussagen über das Substitutionsmuster - vor allem am Ring C - eines zunächst unbekannten Phenoxazons zu machen. Damit wird bezüglich der Strukturermittlung vor allem höher substituierter Phenoxazone eine optimale Ergänzung des (allein oft nicht eindeutigen) ¹H-NMR-Befundes angeboten.

Im Hinblick auf die ungewöhnlichen MS-Zerfallsreaktionen wurden Vorversuche zur Vakuumgasphasenthermolyse²⁵⁾ von Phenoxazonen durchgeführt, um die beim MS-Studium gewonnen Erkenntnisse präparativ zu nutzen^{14,18)}. Die erhaltenen Resultate wurden diskutiert; sie eignen sich als vielversprechender Ansatzpunkt zukünftiger Arbeiten.

Neben Michigazon fielen im Zuge der für die massenspektrometrischen Studien erforderlichen Synthesen einschließlich der spezifisch isoto-penmarkierten Spezies insgesamt mehr als 80 unterschiedlich sub-stituierte Phenoxazone an, von denen bisher nur 5 beschrieben waren (vgl.Tab.12, S.160 ff). Zu ihrer Darstellung mußten bekannte Synthese-verfahren erweitert werden. Häufig wurde - insbesondere bei der Präparation der ¹⁸O-markierten Verbindungen - im Milligramm-Maßstab gearbeitet. Die synthetischen Arbeiten führten im wesentlichen zu folgenden neuen Erkenntnissen:

1. Auch solche 1,4-Benzochinone, die drei- oder vierfach hydroxy-methoxy-substituiert sind, lassen sich unter den Bedingungen der "KEHRMANN-Reaktion" ^{117,124,125)} zu einheitlichen Phenoxazonen umsetzen und eröffnen so den Zugang zu neuen Vertretern dieser Substanzklasse (S.134/135).

2. Weitere bisher nicht beschriebene Phenoxazone sind durch selektive Alkylierung der 2,4-Dihydroxy-Verbindungen zugänglich (S.137).

3. Der Enolcharakter von Hydroxygruppen am Ring C des Phenoxazonring-systems und die Möglichkeit der selektiven Hydrolyse einer (als Enol-ether anzusehenden) Methoxygruppe an C-2 erlauben die Darstellung bisher unbekannter spezifisch isotoopenmarkierter Phenoxazone (S.137 ff).

4. Durch Umsetzung von 2,4-Dimethoxyphenoxazonen mit HCl in THF gelingt die spezifische Einführung eines Chloratoms in die Position 1 (S.144 ff).

Der Ablauf der Synthesereaktionen sowie die beobachteten Reaktivitätsunterschiede bei den eingesetzten Benzochinonen und Phenoxazonen werden unter mechanistischen Gesichtspunkten diskutiert.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. H.ENGELHARDT, Hochdruckflüssigkeitschromatographie, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York 1975
2. R.A.JONES, An Introduction to Gas-Liquid Chromatography, Academic Press, London and New York 1970, p.35
- 3.a) G.SPITELLER, Cron.Chim. 37, 13-21, 40 (1972)
b) K.BIEMANN, Angew.Chem. 74, 102 (1962)
- 4.a) H.D.BECKEY, Int.J.MassSpectrom.IonPhys. 2, 500 (1969)
b) W.D.REYNOLDS, Anal.Chem. 51, 283A (1979)
5. U.RAPP und K.H.MAURER, Application Note No.15, Fa.VARIAN MAT GmbH, Bremen 1973
6. U.RAPP, U.SCHRÖDER, S.MEIER und H.ELMENHORST, Chromatographia 8, 474 (1975)
7. K.MÜLLEN und P.S.PREGOSIN, Fourier Transform NMR Techniques: A Practical Approach, London, New York, San Francisco 1976
8. W.KARL, Dissertation, Freiburg i.Br. 1974
9. A.GIEREN und W.HOPPE, Z.Anal.Chem. 273, 374 (1975)
10. J.H.C.NAYLER, Proc.Roy.Soc.,Ser.B 179, 357 (1971)
11. R.B.WOODWARD, Pure Appl.Chem. 33, 145 (1973)
- 12.a) E.J.COREY, E.J.TRYBULSKI, L.S.MELVIN Jr., K.C.NICOLAON, J.A.SECRIST, R.LETT, P.W.SHELDRAKE, J.R.FALCK, D.J.BRUNELLE, M.F.HASLANGER, SUNGGAK KIM, SUNG-EUN YOO, J.Amer.Chem.Soc. 100, 4618 (1978)
b) E.J.COREY, SUNGGAK KIM, SUNG-EUN YOO, K.C.NICOLAON, L.S.MELVIN Jr., D.J.BRUNELLE, J.R.FALCK, E.J.TRYBULSKI, R.LETT, P.W.SHELDRAKE, J.Amer.Chem.Soc. 100, 4620 (1978)
13. G.SPITELLER, Massenspektrometrische Strukturanalyse organischer Verbindungen, Verlag Chemie GmbH, Weinheim/Bergstr. 1966
14. I.W.BENTLEY und R.A.W.JOHNSTONE, Advan.Phys.Org.Chem. 8, 151 (1970)

- 15.a) R.G.COOKS, Org.Mass Spectrom. 2, 481 (1969)
- b) P.BROWN und C.DJERASSI, Angew.Chem. 79, 481 (1967)
16. F.RAZMARA und E.S.WAIGHT, Org. Mass Spectrom. 11, 1227 (1976)
17. F.G.HOLLIMAN, R.A.W.JOHNSTONE, B.J.MILLARD, J.Chem.Soc.C 1967, 2351
18. R.C.DOUGHERTY, Fortschr.Chem.Forsch. 45, 93 (1974)
19. J.D.KELLEY, C.J.WOLF, J.Chromatogr.Sci. 8, 583 (1970)
20. D.C.DeJONGH und R.Y.Van VOSSEN, J.Org.Chem. 37, 1129 (1972)
21. W.REICHEN, Helv.Chim.Acta 60, 186 (1977)
- 21a. P.De CHAMPLAIN und P.De MAYO, Can.J.Chem. 50, 270 (1972)
22. R.LAWRENCE und E.S.WAIGHT, Org. Mass Spectrom. 3, 367 (1970)
23. T.MUKAI und M.NITTA, J.C.S.Chem.Comm. 1970, 1192
24. D.C.De JONGH, Pyrolytic Reaction Mechanisms, Int.Symp.Anal.Pyrolysis, S.261, Amsterdam 1976 (publ.1977)
25. H.J.HAGEMAN und U.E.WIERSUM, Chem.Br. 9, 206 (1973)
26. J.C.TON, C.S.WANG und E.G.ALLEY, Org. Mass Spectrom. 3, 747 (1970)
- 27.a) R.G.COOKS, J.H.BEYNON, R.M.CAPRIOLI und G.R.LESTER, Metastable Ions, Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, London, New York 1973
- b) R.D.BOWEN, D.H.WILLIAMS und H.SCHWARZ, Angew.Chem. 91, 484 (1979)
28. Lit.^{27a)}, S.160
29. J.H.BEYNON, R.M.CAPRIOLI, W.E.BAITINGER und J.W.AMY, Int.J.MassSpectrom.IonPhys. 3, 313 (1969)
30. J.H.BEYNON, Anal.Chem. 42, 97A (1970)
31. A.F.WESTON, K.R.JENNINGS, S.EVANS und R.M.ELLIOTT, Int.J.MassSpectrom.IonPhys. 20, 317 (1976)
32. J.H.BEYNON und R.G.COOKS, Res./Dev. 22, 26 (1971)
33. U.P.SCHLUNEGGER, Angew.Chem. 87, 731 (1975)
34. Lit.^{27a)}, S.57 ff

35. U.P.SCHLUNEGGER, S.LEUTWYLER, F.FRIEDLI und R.SCHEFFOLD,
Helv.Chim.Acta 58, 65 (1975)
36. K.LEVSEN und H.SCHWARZ, Angew.Chem. 88, 589 (1976)
37. H.SCHWARZ, R.SEZI, U.RAPP, H.KAUFMANN und S.MEIER,
Org. Mass Spectrom. 12, 39 (1977)
38. R.ROBBIANI, T.KUSTER und J.SEIBL, Angew.Chem. 89, 115 (1977)
39. J.L.HOLMES in: International Review of Science, Physical Chemistry,
Series 2, Vol.5: Mass Spectrometry, S.207, Ed. by A.MACCOLL,
Butterworths, London + Boston 1975
40. K.BIEMANN, Mass Spectrometry, Organic Chemical Applications,
McGraw-Hill Book Company, New York, San Francisco, Toronto, London 1962
41. C.G.MacDONALD und J.S.SHANNON, Aust.J.Chem. 15, 771 (1962)
42. T.H.KINSTLE, O.L.CHAPMAN und MING-TA SUNG, J.Amer.Chem.Soc. 90, 1227 (1968)
43. Lit.^{27a)}, S.172
- 44.a) J.P.LEICKNAM, Commis.Energ.At., Rapp.No. 3134 (1967) ;
C.A. 68, 117954j (1968)
- b) G.EADON und R.ZAWALSKI, Org. Mass Spectrom. 12, 599 (1977)
45. H.UMEZAWA, Index of Antibiotics from Actinomycetales, Univ. of Tokyo
Press, Tokyo und Univ. Park Press, State College, Pennsylvania 1967
46. H.ZÄHNER, Privatmitteilung
47. G.WOLF und H.ZÄHNER, Privatmitteilung
48. G.WOLF, Privatmitteilung
49. W.KOHL, Dissertation, Freiburg i.Br. 1977
50. K.UBIK, V.DOSTÁL und V.BEKÁREK, Collect.Czech.Chem.Comm. 42, 3308 (1977)
51. S.PFEIFER, H.BÄR und J.ZARNACK, Pharmazie 27, 536 (1972)
53. J.CASSAN, M.ROUILLARD und M.AZZARO in: Mass Spectrometry in Bio-
chemistry and Medicine, Ed. by A.FRIGERIO and N.CASTAGNOLI,
Raven Press, New York 1974
52. J.CASSAN, M.ROUILLARD, M.AZZARO und R.L.MITAL,
Org. Mass Spectrom. 9, 19 (1974)

54. A.M.OSMAN, S.A.M.METWALLY und M.S.K.YOUSSIF,
IndianJ.Chem. 14B, 199 (1976)
55. L.AUDIER, M.AZZARO, A.CAMBON und R.GUEDJ,
Bull.Soc.Chim.Fr. 1968, 1013
56. A.M.DUFFIELD, J.CYMERMAN CRAIG und L.R.KRAY,
Tetrahedron 24, 4267 (1968)
57. L.AUDIER, A.CAMBON, R.GUEDJ und M.AZZARO,
J.Heterocycl.Chem. 5, 393 (1968)
58. J.N.T.GILBERT und B.J.MILLARD, Org. Mass Spectrom. 2, 17 (1969)
59. R.L.MITAL, S.K.JAIN, M.AZZARO, A.CAMBON und J.P.ROSSER,
Bull.Soc.Chim.Fr. 1970, 2195
60. D.SIMOV und I.G.TAULOV, Org. Mass Spectrom. 5, 1133 (1971)
61. M.D.SADHNANI, N.L.AGARWAL und R.L.MITAL,
Bull.Acad.Pol.,Ser.Sci.Chim. 21, 873 (1973)
62. S.K.JAIN, P.C.TAUNK und R.L.MITAL, Ann.Soc.Sci.Bruxelles, Ser.1
88, 149 (1974)
63. A.P.MELIKIAN, N.W.FLYNN, F.PETTY und J.D.WANDER,
J.Pharm.Sci. 66, 228 (1977)
64. F.G.HOLLIMAN, R.A.W.JOHNSTONE, B.J.MILLARD, J.Chem.Soc.C 1967, 2351
65. H.ZÄHNER, Biologie der Antibiotika, S.23, Springer-Verlag,
Berlin, Heidelberg, New York 1965
66. G.WOLF, Privatmitteilung
67. Lit.⁴⁵⁾, S.421/422
68. J.S.WEBB, D.B.COSULICH et al., J.Amer.Chem.Soc. 84, 3185,3187 (1962)
- 69.a) A.TULINSKY, J.Amer.Chem.Soc. 84, 3188 (1962)
b) A.TULINSKY und J.H.VAN DEN HENDE, J.Amer.Chem.Soc. 89, 2905 (1967)
70. G.E.VanLEAR, Tetrahedron 26, 2587 (1970)
71. Lit.¹³⁾, S.38
72. H.D.BECKEY und H.-R.SCHULTEN, Angew.Chem. 87, 425 (1975)

73. Lit.¹³⁾, S.146 f
74. H.BUDZIKIEWICZ, C.DJERASSI und D.H.WILLIAMS, Mass Spectrometry of Organic Compounds, S.25, Holden-Day Inc., San Francisco, Cambridge, London, Amsterdam 1967
75. Lit.⁷⁴⁾, S.115
- 76.a) A.BUTENANDT, U.SCHIEDT, E.BIEKERT und R.J.T.CROMARTIE, Liebigs Ann.Chem. 590, 75 (1954)
- b) A.BUTENANDT, E.BIEKERT und W.SCHÄFER, Liebigs Ann.Chem. 632, 134,143 (1960)
- c) H.MUSSO und H.-G.MATTHIES, Chem.Ber. 90, 1814 (1957)
- d) V.STUZKA und E.SINDELÁROVÁ, Collect.Czech.Chem.Comm. 42, 1332 (1977)
- 77.a) H.MUSSO und H.KRÄMER, Chem.Ber. 91, 2001 (1958)
- b) H.MUSSO und D.MAASSEN, Chem.Ber. 95, 2831 (1962)
- c) J.F.CORBETT, Spectrochim.Acta 21, 1411 (1965)
- d) H.MUSSO, K.SPAUKE und K.R.WALTER, Chem.Ber. 100, 1436 (1967)
78. W.SCHÄFER und I.GEYER, Tetrahedron 28, 5261 (1972)
- 79.a) A.BUTENANDT, E.BIEKERT und U.BAUMANN, Arch.Biochem.Biophys. 69, 100 (1957)
- b) J.GRIPENBERG und J.MARTIKKALA, Acta Chem.Scand. 19, 1051 (1965)
- 80.a) A.BUTENANDT, J.KECK und G.NEUBERT, Liebigs Ann.Chem. 602, 61 (1957)
- b) A.BUTENANDT, E.BIEKERT, H.KÜBLER und B.LINZEN, Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 319, 238 (1960)
81. J.GRIPENBERG, Acta Chem.Scand. 13, 1305 (1959)
82. G.W.K.CAVILL, P.S.CLEZY und F.B.WHITFIELD, Tetrahedron 12, 139 (1961)
83. K.P.ZELLER, Mass Spectra of Quinones, in: The Chemistry of the Quinonoid Compounds, Part 1, S.231 ff, Ed. by S.PATAI, John Wiley & Sons, London, New York, Sydney, Toronto 1974
84. Lit.¹³⁾, S.73

85. Lit.⁸³⁾, S.251
86. W.J.RICHTER und J.G.LIEHR, Tetrahedron Lett. 1972, 4503
87. Lit.⁷⁴⁾, S.227 ff
88. C.S.BARNES und J.L.OCCOLOWITZ, Aust.J.Chem. 16, 219 (1963)
89. C.S.BARNES, D.J.COLLINS, J.J.HOBBS, P.I.MORTIMER und W.H.F.SASSE, Aust.J.Chem. 20, 699 (1967)
90. H.FLORENCIO, W.HEERMA und P.C.VIJFHUIZEN
Org. Mass Spectrom. 13, 735 (1978)
91. H.FLORENCIO, W.HEERMA und G.DIJKSTRA,
Org. Mass Spectrom. 12, 269 (1977)
92. Lit.⁷⁴⁾, S.143 ff
93. J.KOSSANYI und J.K.MOGTO, Org. Mass Spectrom. 3, 721 (1970)
94. J.D.HENION und D.G.I.KINGSTON, Org. Mass Spectrom. 13, 431 (1978)
- 95.a) J.H.BEYNON und A.E.WILLIAMS, Appl.Spectrosc. 14, 156 (1960)
- b) J.H.BOWIE und P.Y.WHITE, J.Chem.Soc.B 1969, 89
96. siehe z.B.: H.BUDZIKIEWICZ, C.D.JERASSI und D.H.WILLIAMS, Structure Elucidation of Natural Products by Mass Spectrometry, Vol. II, S.252, Holden-Day Inc., San Francisco, London, Amsterdam 1964
97. R.SMAKMAN und Th.J.DeBOER, Org. Mass Spectrom. 1, 403 (1968)
98. I.C.CALDER, R.B.JOHNS und J.M.DESMARCHELIER,
Org. Mass Spectrom. 4, 121 (1970)
99. Lit.⁷⁴⁾, S.245
100. J.MOMIGNY, Bull.Soc.R.Sci.Liege 25, 93 (1956)
101. K.G.DAS und K.P.MADHUSUDANAN, Org. Mass Spectrom. 11, 135 (1976)
102. M.M.BURSEY, Org. Mass Spectrom. 2, 907 (1969)
103. G.M.RUBOTTOM, J.Chem.Educ. 51, 616 (1974)
104. Z.PELAH, J.M.WILSON, M.OHASHI, H.BUDZIKIEWICZ und C.D.JERASSI, Tetrahedron 19, 2233 (1963)

105. G. BOUCHOUX, *Org. Mass Spectrom.* 13, 184 (1978)
106. V. HANUŠ and V. ČERMÁK, *Collect. Czech. Chem. Commun.* 24, 1602 (1959)
107. P. B. TERENT'EV, A. N. KOST und J. LANGE,
Org. Mass Spectrom. 9, 1022 (1974)
108. H. BUDZIKIEWICZ, R. SCHEIPERS und J. RULLKÖTTER,
Org. Mass Spectrom. 12, 732 (1977)
109. E. M. EMERY, *Anal. Chem.* 32, 1495 (1960)
110. J. H. BOWIE, D. W. CAMERON, R. G. F. GILES und D. H. WILLIAMS,
J. Chem. Soc. B 1966, 335
111. H. J. HAGEMAN und U. E. WIERSUM, *Tetrahedron Lett.* 1971, 4329
112. H. J. HAGEMAN und U. E. WIERSUM, *J. C. S. Chem. Commun.* 1971, 497
113. R. C. DOUGHERTY, H. E. BERTORELLO und M. MARTINEZ DE BERTORELLO,
Org. Mass Spectrom. 5, 1321 (1971)
114. Yu. K. SHAPOSHNIKOV und L. V. KOSYNKOVA, *Khim. Pererab. Drev.*,
Ref. Inform. 3, 6 (1965); *C. A.* 66, 37557a (1967)
115. A. N. KISLITSYN, V. I. SAVINYKH und V. A. LATYSHEVA, *Zh. Prikl. Khim.*
45, 384 (1972); *C. A.* 77, 4654d (1972)
116. Ph. D. PACEY, *Chem. Phys. Lett.* 23, 394 (1973)
117. W. SCHÄFER in: *Progress in Organic Chemistry*, Vol. 6, S. 135,
Ed. J. COOK + W. CARRUTHERS, Butterworths, London 1964
118. a) H. MUSSO und H. BEECKEN, *Chem. Ber.* 94, 585 (1961)
b) H. MUSSO und W. STECKELBERG, *Chem. Ber.* 101, 1510 (1968)
119. a) V. STUZKA, M. MARTINEK und L. ČÁP, *Monatsh. Chem.* 100, 1670 (1969)
b) V. STUZKA und M. BILÍKOVÁ, *Monatsh. Chem.* 98, 1754 (1967)
120. E. RUZICKA, V. BEKÁREK und P. HEINZ,
Collect. Czech. Chem. Commun. 37, 1905 (1972)
121. A. BUTENANDT, E. BIEKERT und G. NEUBERT, *Liebigs Ann. Chem.* 602, 72 (1957)
122. T. HISHIDA, T. NOGAMI, Y. SHIVORA und H. MIKAWA, *Chem. Lett.* 1974, 293
123. H. BROCKMANN und F. SEELA, *Chem. Ber.* 104, 2751 (1971)

124. W.SCHÄFER und H.SCHLUDE, *Tetrahedron* 27, 4721 (1971)
125. H.MUSSO, D.DÖRP und J.KUHLS, *Chem.Ber.* 98, 3937 (1965)
126. H.BROCKMANN, *Fortschr.Chem.Org.Naturst.* 18, 1 (1960)
127. E.DIEPOLDER, *Ber.Deut.Chem.Ges.* 35, 2816 (1902)
128. D.E.PEARSON in: *Heterocyclic Compounds*, Vol.6, S.689,
Ed. R.C.ELDERFIELD, John Wiley & Sons, New York 1957
129. W.SCHÄFER und H.SCHLUDE, *Tetrahedron Lett.* 1968, 2161
130. H.BROCKMANN und H.MUXFELDT, *Chem.Ber.* 91, 1242 (1958)
131. W.BAKER, *J.Chem.Soc.* 1941, 662
132. C.GRAEBE und H.HESS, *Liebigs Ann.Chem.* 340, 232 (1905)
133. G.AULIN und H.ERDTMAN, *Sv.Kem.Tidskr.* 49, 208 (1937)
134. H.BROCKMANN, H.GRÖNE und G.PAMPUS, *Chem.Ber.* 91, 1916 (1958)
135. A.J.FATIADI und W.F.SAGER in: *Organic Synthesis*, Coll.Vol.5,
S. 1011, John Wiley & Sons, New York, London, Sydney, Toronto 1973
136. K.WALLENFELS und K.FRIEDRICH, *Chem.Ber.* 93, 3070 (1960)
137. R.G.JONES und H.A.SHONLE, *J.Amer.Chem.Soc.* 67, 1034 (1945)
138. B.RAFFELSBERGER, *Diplomarbeit*, Freiburg i.Br. 1975
139. V.ŠIMÁNEK, J.ÍASOVSKÝ, V.STUŽKA und L.HRUBAN,
Collect.Czech.Chem.Comm. 35, 3064 (1970)
140. F.EFFENBERGER, *Angew.Chem.* 81, 374 (1969)
141. H.HENECKA in: *Methoden der organischen Chemie (Houben-Weyl)*,
Bd.IV, Tl.2, S.13/14, Georg Thieme Verlag Stuttgart 1955
142. H.BROCKMANN und H.GRÖNE, *Angew.Chem.* 68, 66 (1956)
143. E.VILSMAIER und G.ADAM, *Liebigs Ann.Chem.* 757, 181 (1972)
144. Ch.B.JAEGER Jr., *U.S.* 2, 385, 282, Sept.18 (1945);
C.A. 40, 1883 (1946)
- 145.a) O.MÜHLHÄUSER, *Liebigs Ann.Chem.* 207, 235 (1881)
b) W.WILL, *Ber.Deut.Chem.Ges.* 21, 602, 605 (1888)

146. M.MATSUOKA, J.Antibiot.Ser.A 13, 121 (1960)
147. N.N.GERBER, Biochemistry 5, 3824 (1966)
148. N.N.GERBER und M.P.LECHEVALIER, Biochemistry 3, 598 (1964)
149. N.N.GERBER, J.Org.Chem. 32, 4055 (1967)
- 150.a) J.GRIPENBERG, Acta Chem.Scand. 5, 590 (1951)
b) G.W.K.CAVILL, B.J.RALPH, J.R.TETAZ und R.L.WERNER,
J.Chem.Soc. 1953, 525
c) J.GRIPENBERG, Acta Chem.Scand. 12, 603 (1958)
151. J.GRIPENBERG, E.HONKANEN und O.PATOHARJU,
Acta Chem.Scand. 11, 1485 (1957)
152. J.GRIPENBERG, Acta Chem.Scand. 17, 703 (1963)
153. U.P.SCHLUNEGGER, A.KUCHEN und H.CLÉMENTON,
Helv.Chim.Acta 59, 1383 (1976)
154. A.BUTENANDT und W.SCHÄFER in: Recent Progress in the Chemistry of
Natural and Synthetic Coloring Matters, S.13, Academic Press, N.Y. 1962
155. H.BEECKEN, E.-M.GOTTSCHALK et al., Angew.Chem. 73, 665 (1961)
- 156.a) A.BUTENANDT, E.BIEKERT und B.LINZEN, Z.Physiol.Chem. 305, 284 (1956)
b) A.BUTENANDT, Angew.Chem. 69, 16 (1957)
157. A.SIVAK, M.L.MELONI, F.NOBILI und E.KATZ,
Biochim.Biophys.Acta 57, 283 (1962)
158. H.R.SCHÜTTE in: Biosynthese der Alkaloide, S.665 ff, Ed. K.MOTHES
und H.R.SCHÜTTE, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin 1969
159. K.ANZAI, K.ISONO, K.OKUMA und S.SUZUKI,
J.Antibiot.Ser.A 13, 125 (1960)
160. U.HORNEMANN, J.P.KEHRER, C.S.NUNEZ und R.L.RANIERI,
J.Amer.Chem.Soc. 96, 320 (1974)
- 161.a) U.HORNEMANN und J.C.CLOYD, J.C.S.Chem.Comm. 1971, 301
b) U.HORNEMANN und M.J.AIKMAN, J.C.S.Chem.Comm. 1973, 88
c) U.HORNEMANN, J.P.KEHRER und J.H.EGGERT, J.C.S.Chem.Comm. 1974, 1045

162. R.REINER, Antibiotica und ausgewählte Chemotherapeutica,
Georg Thieme Verlag Stuttgart 1974
163. K.V.RAO, K.BIFMANN und R.B.WOODWARD, J.Amer.Chem.Soc. 85, 2532 (1963)
164. K.V.RAO und W.P.CULLEN, Antibiot.Annu. 1959/1960, 950
165. T.K.PASHKEVICH, G.B.AFANAS'EVA et al., Khim.Farm.Zh. 10, 77 (1976);
C.A. 85, 40642x (1976)
166. W.SZYBALKSI und V.N.IYER in: Antibiotics, Vol.1, Mechanism of Action,
S.211, Ed. D.GOTTLIEB und P.D.SHAW, Springer-Verlag, Berlin, Heidel-
berg, New York 1967
167. H.L.WHITE und J.R.WHITE, Biochim.Biophys.Acta 123, 648 (1966)
- 168.a) B.A.NEWTON und P.E.REYNOLDS, Biochemical Studies of Antimicrobial
Drugs, S.274, Cambridge University Press 1966
b) F.SEELA, Z.Naturforsch.TeilB 26, 875 (1971)
c) B.A.K.CHIBBER, A.BALASUBRAMANIAN und T.VISWANATHA,
Can.J.Biochem. 51, 204 (1973)
169. Y.HARADA, O.ARAO et al., Japan.5400('62); C.A. 59, P6955h (1963)
170. W.G.TAYLOR und W.A.REMERS, Tetrahedron Lett. 39, 3483 (1974)
171. T.L.FOLK, L.G.WIDEMAN und K.S.COTTMAN,
Org. Mass Spectrom. 14, 286 (1979)
172. Lit.¹³⁾, S.176/177
- 173.a) P.GERMERAAD und H.W.MOORE, J.Org.Chem. 39, 774 (1974)
b) K.J.FALCI, Dissertation; C.A. 86, 121025w (1977)
c) R.W.FRANCK, K.MIYANO und J.F.BLOUNT, Heterocycles 9, 807 (1978)
d) M.AKIBA, Y.KOSUGI und T.TAKADA, Heterocycles 9, 1607 (1978)
174. A.BUTENANDT, U.SCHIEDT und E.BIEKERT, Liebigs Ann.Chem. 588, 106 (1954)
175. B.WEINSTEIN und D.N.BRATTESANI, J.Heterocycl.Chem. 4, 151 (1967)
176. H.BROCKMANN und H.LACKNER, Tetrahedron Lett. 47, 3517 (1964)
177. R.BRESLOW, Chem.Soc.Rev. 1, 553 (1972)
178. H.J.SCHLUDE und W.SCHÄFER, Tetrahedron Lett. 44, 4317 (1967)

179. W.von E.DOERING und E.DORFMAN, J.Amer.Chem.Soc. 75, 5595 (1953)
180. U.HORNEMANN, Privatmitteilung
181. R.CORBAZ, L.ETTLINGER, W.KELLER-SCHIFRLEIN und H.ZÄHNER, Arch.Mikrobiol. 26, 192 (1957)
182. A.HANTZSCH, Liebigs Ann.Chem. 492, 65 (1932)
183. A.EINHORN und B.PFYL, Liebigs Ann.Chem. 311, 34 (1900)
184. BEILSTEIN, Hauptwerk, Bd.13, S.800
185. E.NÖLTING und O.KOHN, Ber.Deut.Chem.Ges. 17, 351, 360 (1884)
186. R.NIETZKI und F.SCHMIDT, Ber.Deut.Chem.Ges. 21, 2374 (1888)
187. W.K.ANSLOW und H.RAISTRICK, J.Chem.Soc. 1939, 1446
- 188.a) E.CHAPMAN, A.G.PERKIN und R.ROBINSON, J.Chem.Soc. 1927, 3015
b) M.KOHN und S.GRÜN, Monatsh.Chem. 46, 75 (1925)
189. C.GRAEBE und H.HESS, Liebigs Ann.Chem. 340, 232 (1905)
190. F.MAUTHNER, J.Prakt.Chem. 147, 287 (1937)
191. H.O.HUISMAN, Rec.Trav.Chim.Pays-Bas 69, 1133 (1950)
192. S.FUJISAWA und M.KAWAMURA, Yakugaku Zasshi 86, 541 (1966);
C.A. 65, 15373g (1966)
193. H.BROCKMANN und E.SCHULZE, Chem.Ber. 102, 3205 (1969)

Lebenslauf

Am 6. Februar 1949 wurde ich als Sohn des Speditionskaufmanns Friedrich Wörth und seiner Ehefrau Anna, geb. Thelen, in Rheinhausen (ehem. Kreis Moers, NRW) geboren. Nach dem Besuch der Grundschule (1955-1959) und im Anschluß daran des Städt. mathem.-naturw. Gymnasiums in Rheinhausen legte ich im Juli 1967 die Reifeprüfung ab.

Das Chemie-Studium begann ich im Wintersemester 1967/68 an der Universität Freiburg, wo ich im Juli 1969 die Diplomchemiker-Vorprüfung und im Mai 1971 die mündliche Diplomchemiker-Hauptprüfung bestand. Die Diplomarbeit mit dem Titel "Untersuchungen zur thermischen Zersetzung von Kawa-Lactonen des Kawain-Typs" stand wie die vorliegende Arbeit unter der Leitung von Prof. Dr. H. Achenbach und wurde im März 1972 abgeschlossen.

Im Anschluß daran war ich am Aufbau der Zusammenarbeit zwischen unserer Arbeitsgruppe und dem Team des Tübinger Mikrobiologen Prof. Dr. H. Zähner beteiligt und in diesem Zusammenhang mit der näheren Untersuchung verschiedener Extrakte aus Streptomyceten-Kulturen befaßt. Erste geringe Mengen des Rohextraktes, der den Ausgangspunkt der vorliegenden Dissertation bildete, erhielten wir zu Beginn des Jahres 1973. Experimentell abgeschlossen wurde die Dissertation im Herbst 1978.

Seit Juli 1974 bin ich - zeitlich parallel zur Anfertigung der vorliegenden Arbeit - als wissenschaftlicher Angestellter beim Chemischen Laboratorium der Universität Freiburg mit der Betreuung von zwei Massenspektrometern beauftragt. Seither obliegt mir auch der massenspektrometrische Service für die Mitarbeiter aller Abteilungen der organischen Chemie unseres Instituts.

